

**BEST AVAILABLE COPY****MACHINE-ASSISTED TRANSLATION (MAT):**

(19)【発行国】 日本国特許庁 ( J P )	(19)[ISSUINGCOUNTRY] Japanese Patent Office (JP)
(12)【公報種別】 公開特許公報 ( A )	Laid-open (Kokai) patent application number (A)
(11)【公開番号】 特開 2 0 0 0 - 1 3 9 4 7 1 ( P 2 0 0 0 - 1 3 9 4 7 1 A )	(11)[UNEXAMINEDPATENTNUMBER] Unexamined Japanese Patent 2000-139471 (P2000-139471A)
(43)【公開日】 平成 1 2 年 5 月 2 3 日 ( 2 0 0 0 . 5 . 2 3 )	(43)[DATEOFFIRSTPUBLICATION] May 23rd, Heisei 12 (2000.5.23)
(54)【発明の名称】 発酵法による L - メチオニンの 製造法	(54)[TITLE] The manufacturing method of L- methionine by the fermentation method
(51)【国際特許分類第 7 版】 C12N 15/09 ZNA 1/21 9/04 9/10 9/12 9/88 C12P 13/12 /(C12N 15/09 ZNA C12R 1:19 ) (C12N 1/21 C12R 1:19 ) (C12P 13/12 C12R 1:19 )	(51)[IPC] C12N15/09 ZNA 1/21 9/04 9/10 9/12 9/88 C12P13/12 /(C12N15/09 ZNA C12R 1:19 ) (C12N 1/21 C12R 1:19 ) (C12P13/12 C12R 1:19 )
【 F I 】 C12N 15/00 ZNA A 1/21 9/04 A 9/10	【 F I 】 C12N15/00 ZNAA 1/21 9/04 A 9/10 9/12

9/12  
9/88  
C12P 13/12 A9/88  
C12P13/12 A

【審査請求】 未請求

[EXAMINATIONREQUEST] UNREQUESTED

【請求項の数】 1 1

[NUMBEROFCLAIMS] 11

【出願形態】 O L

[Application form] OL

【全頁数】 2 3

[NUMBEROFPAGES] 23

(21) 【出願番号】

特願平 1 0 - 3 2 6 7 1 7

(21)[APPLICATIONNUMBER]

Japanese-Patent-Application-No. 10-326717

(22) 【出願日】

平成 1 0 年 1 1 月 1 7 日 ( 1 9  
9 8 . 1 1 . 1 7 )

(22)[DATEOFFILING]

November 17th, Heisei 10 (1998.11.17)

(71) 【出願人】

(71)[PATENTEE/ASSIGNEE]

【識別番号】

0 0 0 0 0 0 6 6

[IDCODE]

000000066

【氏名又は名称】

味の素株式会社

Ajinomoto Co., Inc. K.K.

【住所又は居所】

東京都中央区京橋 1 丁目 1 5 番  
1 号

[ADDRESS]

(72) 【発明者】

(72)[INVENTOR]

【氏名】 臼田 佳弘

Yoshihiro Usuda

【住所又は居所】

神奈川県川崎市川崎区鈴木町 1  
- 1 味の素株式会社発酵技術研  
究所内

[ADDRESS]

(72) 【発明者】

(72)[INVENTOR]

【氏名】 倉橋 修

Osamu Kurahashi

【住所又は居所】

[ADDRESS]

神奈川県川崎市川崎区鈴木町 1  
— 1 味の素株式会社発酵技術研  
究所内

(74) 【代理人】

(74)[PATENTAGENT]

【識別番号】

[IDCODE]

1 0 0 0 8 9 2 4 4

100089244

【弁理士】

[PATENTATTORNEY]

【氏名又は名称】

遠山 勉 (外 2 名)

Tsutomu Toyama (et al.)

【テーマコード (参考)】

[Theme code (reference)]

4B024

4B024

4B050

4B050

4B064

4B064

4B065

4B065

【F ターム (参考)】

[F term (reference)]

4B024 AA01 AA03 BA71 CA02  
CA06 DA05 DA06 EA044B024AA01AA03BA71CA02CA06DA05DA06E  
A04

4B050 CC04 DD02 LL01

4B050CC04DD02LL01

4B064 AE16 CA02 CA19 CD13  
DA01 DA16

4B064AE16CA02CA19CD13DA01DA16

4B065 AA26X AA26Y AB01 4

4B065AA26XAA26YAB01AC14BA02CA17CA4

AC14 BA02 CA17 CA44

(57) 【要約】

(57)[SUMMARY]

【課題】

[SUBJECT]

L-メチオニン生産能を有する  
微生物を育種し、同微生物を用  
いて発酵法により L-メチオニ  
ンを製造する。The breeding of the microorganism which has  
L- methionine producing ability is carried out,  
and L- methionine is produced by the  
fermentation method using the same  
microorganism.

**【解決手段】**

L-メチオニン生合成系のリプレッサーを欠損し、及び／又は、細胞内のホモセリントランスサクシニラーゼ活性が増強され、好ましくは、さらに細胞内のS-アデノシルメチオニンシンテース活性が弱体化し、L-スレオニン要求性を示し、細胞内のシスタチオニンγ-シンテース活性及びアスパルトキナーゼ-ホモセリンデヒドロゲナーゼ II 活性が増強された微生物を培地に培養し、培地中にL-メチオニンを生成蓄積せしめ、これを該培地から採取することにより、L-メチオニンを製造する。

**【特許請求の範囲】****【請求項 1】**

L-メチオニン生合成系のリプレッサーを欠損し、かつ、L-メチオニン生産能を有する微生物。

**【請求項 2】**

細胞内のホモセリントランスサクシニラーゼ活性が増強され、かつ、L-メチオニン生産能を有する微生物。

**【請求項 3】**

L-メチオニン生合成系のリプレッサーを欠損し、細胞内のホモセリントランスサクシニラーゼ活性が増強され、かつ、L-メチオニン生産能を有する微生物。

**【請求項 4】****[SOLUTION]**

Microorganisms defective in the repressor of L-methionine biosynthesis system, and/or, intensified in an intracellular homoserine transsuccinylase activity preferably, weakened in an intracellular S-adenosylmethioine synthetase activity, showing L- threonine requirement property, and intensified in the intracellular cystathionine (gamma)- synthase activity and the aspartokinaze - homoserine dehydrogenase II activity are cultured in a medium.

L- methionine is made to produce-accumulate in a medium. L- methionine is produced by collecting this from this medium.

**[CLAIMS]****[CLAIM 1]**

Microorganisms defective in the repressor of L-methionine biosynthesis system and having L-methionine producing ability.

**[CLAIM 2]**

Microorganisms intensified in an intracellular homoserine transsuccinylase activity and having L- methionine producing ability.

**[CLAIM 3]**

Microorganisms defective in the repressor of L-methionine biosynthesis system, and intensified in an intracellular homoserine transsuccinylase activity and havving L- methionine producing ability.

**[CLAIM 4]**

Furthermore microorganisms given in any one

さらに細胞内のS-アデノシル  
メチオニンシンテース活性が  
弱化した請求項1～3のいずれ  
か一項に記載の微生物。

**【請求項5】**

ホモセリントランスサクシニラ  
ーゼ活性の増強が、前記微生物  
細胞内のホモセリントランスサ  
クシニラーゼをコードする遺伝  
子のコピー数を高めること、又  
は同遺伝子の発現調節配列を増  
強することによるものである請  
求項2～4記載の微生物。

**【請求項6】**

L-メチオニンとS-アデノシ  
ルメチオニンによる協奏阻害が  
解除されたホモセリントランス  
サクシニラーゼを保持する請求  
項1又は4に記載の微生物。

**【請求項7】**

L-スレオニン要求性を示すこ  
とを特徴とする請求項1～6の  
いずれか一項に記載の微生物。

**【請求項8】**

細胞内のシスタチオニッシー  
ンテース活性及びアスパルトキ  
ナーゼ-ホモセリンデヒドロゲ  
ナーゼII活性が増強された請求  
項1～7のいずれか一項に記載  
の微生物。

**【請求項9】**

エシェリヒア属に属することを  
特徴とする請求項1～8のいづ  
れか一項に記載の微生物。

**【請求項10】**

請求項1～9のいずれか一項に

of Claims 1-3 which weakened the intracellular  
S-adenosylmethioine synthetase activity.

**[CLAIM 5]**

Microorganisms of Claims 2-4, wherein  
Intensification of a homoserine transsuccinylase  
activity is based on by raising the number of  
copies of the gene which codes the above-  
mentioned microorganisms intracellular  
homoserine transsuccinylase, or intensifying  
the expression control sequence of said gene.

**[CLAIM 6]**

Microorganisms of Claim 1 or 4 holding the  
homoserine transsuccinylase by which the  
concerned inhibition by L- methionine and the  
S-adenosylmethioine was released.

**[CLAIM 7]**

L- threonine request property is shown.

Microorganisms described in any 1 item of  
Claims 1-6 characterized by the above-  
mentioned.

**[CLAIM 8]**

Microorganisms described in any one of Claims  
1-7 wherein the intracellular cystathionine  
(gamma)- synthase activity and the  
aspartokinase -homoserine dehydrogenase II  
activity were intensified.

**[CLAIM 9]**

It belongs to an Escherichia genus.

Microorganisms described in any 1 item of  
Claims 1-8 characterized by the above-  
mentioned.

**[CLAIM 10]**

A manufacturing method of L- methionine, in

記載の微生物を培地に培養し、培地中にL-メチオニンを生成蓄積せしめ、これを該培地から採取することを特徴とするL-メチオニンの製造法。

**【請求項 11】**

配列番号 26 に示すアミノ酸配列において、27 位のアルギニンがシステインに置換する変異、296 位のイソロイシンがセリンに置換する変異、298 位のプロリンがロイシンに置換する変異、27 位のアルギニンがシステインに置換しかつ 296 位のイソロイシンがセリンに置換する変異、296 位のイソロイシンがセリンに置換しかつ 298 位のプロリンがロイシンに置換する変異、298 位のプロリンがロイシンに置換しかつ 27 位のアルギニンがシステインに置換する変異、又は、27 位のアルギニンがシステインに置換し、296 位のイソロイシンがセリンに置換しかつ 298 位のプロリンがロイシンに置換する変異のいずれかに相当する変異を有するアミノ酸配列を有し、L-メチオニンとS-アデノシルメチオニンによる協奏阻害が解除されたホモセリントランスサクシニラーゼをコードするDNA。

**【発明の詳細な説明】****【0001】****【発明の属する技術分野】**

本発明は、発酵法によるL-メ

which microorganisms described in any 1 item of Claims 1-9 are cultivated to a culture medium.

In a culture medium, L- methionine is made to produce-accumulate and this is collected from this culture medium.

**[CLAIM 11]**

In the amino acid sequence shown in sequence number 26, it has the amino acid sequence which has the mutation which carries out an equivalent to any one of the mutation which arginine of the 27th position substitutes to cysteine, the mutation which isoleucine of the 296th position substitutes to serine, the mutation which the proline of the 298th position substitutes to a leucine, the mutation which arginine of the 27th position substitutes to cysteine, and isoleucine of the 296th position substitutes to serine, the mutation which isoleucine of the 296th position substitutes to serine, and the proline of the 298th position substitutes to a leucine, the mutation which the proline of the 298th position substitutes to a leucine, and arginine of the 27th position substitutes to cysteine, Or, the mutation which arginine of the 27th position substitutes to cysteine, and isoleucine of the 296th position substitutes to serine, and the proline of the 298th position substitutes to a leucine.

DNA which codes the homoserine transsuccinylase in which the concerned\_inhibition by L- methionine and the S-adenosylmethioine was released.

**[DETAILED DESCRIPTION OF INVENTION]****[0001]****[TECHNICAL FIELD]**

This invention relates to the manufacturing

チオニンの製造法に関する。L-メチオニン、は、医薬等として重要なアミノ酸である。

method of L- methionine by the fermentation method.

L- methionine is an amino acid important as a pharmaceutical etc.

## 【0002】

## [0002]

## 【従来の技術】

メチオニンは、工業的には化学合成により製造されるDL体が中心となっている。L体が必要な場合は、このDL体をアセチル化してN-アセチル-DL-メチオニンとし、酵素的にL体だけを脱アセチル化することによって製造される。

## [PRIOR ART]

DL object with which methionine is industrially manufactured by chemo synthesis becomes the center.

When a L-form is required, it carries out that it is acetylated of this DL object, and it considers as N-acetyl- DL-methionine.

It manufactures by carrying out the deacetylation only of the L-form enzymatically.

## 【0003】

## [0003]

一方、発酵法によるL-メチオニンの製造については、メチオニンアナログ耐性変異株を用いる方法が報告されているが、生産量は少なく、またL-メチオニン生産に影響を与える因子は明らかではないため、最も発酵生産が困難なアミノ酸の一つである。例えば、エシェリヒア・コリ (Escherichia coli (E. coli)) K-12株を用いる方法が、公開特許公報昭56-35992あるいは文献(Chattapadhyay, M. K. et al., Med. Sci. Res. 23, 775 (1995), Chattapadhyay, M. K. et al., Biotechnol. Lett. 17, 567-570 (1995))に報告されているが、いずれもL-メチオニンの生産量は工業的に用いるには不十分であった。

On the other hand, about manufacture of L-methionine by the fermentation method, the method of using a methionine analog resistant mutant is reported.

However, throughput is few. Moreover the factor which affects L- methionine production is not clear. Therefore, fermentation production is the most difficult. It is one of the amino acids.

For example, the method using K-12 strain (Escherichia coli (E. coli)) of Escherichia \* coli, is reported to the laid-open (Kokai) patent application number Showa 56-35992 or reference (Chattapadhyay, M. Ketal., Med.Sci.Res.23,775 (1995), Chattapadhyay, M.Ketal., Biotechnol.Lett.17,567-570 (1995)).

However, all of the throughput of L-methionine were inadequate for using industrially.

## 【0004】

## [0004]

E. coliにおいては、L-メチオニンの生合成経路は、L-スレ

E. In coli, the biosynthesis route of L-methionine is as common as the biosynthesis

オニンの生合成経路と一部共通であり、L-ホモセリンが共通の中間体となっている。L-ホモセリンからL-メチオニンへの固有経路の第一段階は、ホモセリントランスサクシニラーゼ (HTS) によって触媒されるが、同酵素は最終生産物であるL-メチオニンとL-メチオニンの代謝物であるS-アデノシルメチオニンにより協奏的な阻害を受けることが知られている (Lee, L.-W. et al., J. Biol. Chem. 241, 5479-5480 (1966))。

## 【0005】

E. coli のホモセリントランスサクシニラーゼをコードする遺伝子である metA 配列は、ダクロスらにより報告されており (Duclos, B. et al., Nucleic Acids Res. 17, 2856 (1989))、metA の変異株の取得についても、L-メチオニンのアナログである  $\alpha$ -メチル-DL-メチオニン (MM) に対する耐性を利用した方法が知られている (Chattopadhyay, M. K. et al., J. Gen. Microbiol. 137, 685-691 (1991))。しかし、MM耐性株の metA 遺伝子産物であるホモセリントランスサクシニラーゼが、L-メチオニンとS-アデノシルメチオニン (SAM) による阻害解除型となるという報告は、サルモネラ・チフィムリウム (Salmonella typhimurium) においてなされているが (Lawrence, D. A. et al., J. Bacteriol. 109, 8-11 (1972))、変異型 metA 遺伝子の塩基配列の

route of L- threonine in part.

L- homoserine becomes the common intermediate.

The first stage of the intrinsic route to L- methionine is catalysed by the homoserine transsuccinylase (HTS) from L- homoserine.

However, it is known that said enzyme will receive the concerned inhibition by the S- adenosylmethioine which is the metabolite of L- methionine and L- methionine which is a final product (Lee, L.-W.etal., J.Biol.Chem.241, 5479-5480 (1966)).

## [0005]

E. metA sequence which is the gene which codes the homoserine transsuccinylase of coli is reported by Duclos et al. (Duclos, B.etal., NucleicAcidsRes.17, 2856(1989)), the method of having utilized resistance with respect to (alpha)- methyl- DL-methionine (MM) which is the analog of L- methionine, also with acquisition of the mutant of metA is known. (Chattopadhyay, M.Ketal., J.Gen.Microbiol.137,685-691 (1991)).

However, the homoserine transsuccinylase which is metA gene product of MM resistant strain serves as the obstruction releasing type by L- methionine and the S-adenosylmethioine (SAM). This report is made in the Salmonella \* typhimurium (Salmonellatyphimurium) (Lawrence, D.A.etal., J.Bacteriol.109, 8-11 (1972)). There is no report of the base sequence of a variant metA gene.

Furthermore, it is reported that the independent mutant of metA does not emit L- methionine. (Chattopadhyay, M.Ketal., J.Gen.Microbiol.137,685-691 (1991)).



報告はない。さらに、metA の単独変異株は、L-メチオニン を排出しないと報告されている (Chattopadhyay, M. K. et al., J. Gen. Microbiol. 137, 685-691 (1991))。

## 【0006】

metA を含めて、ホモセリントランスサクシニラーゼによる反応以降のL-メチオニンの固有生合成経路の酵素遺伝子の発現は、metJ 遺伝子産物であるリプレッサーによる抑制を受けることも明らかとなっている (Greene, R. C., Biosynthesis of Methionine. in "Escherichia coli and Salmonella Cellular and Molecular Biology/Second Edition", ed. Neidhardt, F. D., ASM Press, pp. 542-560 (1996).)。metJ 遺伝子は、L-メチオニンへの固有生合成経路の第二の酵素シスタチオニョーシンテースをコードする metB 遺伝子と、アスパルトキナーゼ-ホモセリンデヒドロゲナーゼ II (AK-HDII) をコードする metL とからなる metBL オペロンと、逆向きに隣接していることが知られている (Duchange, N. et al., J. Biol. Chem. 258, 14868-14871 (1983))。

## 【0007】

L-メチオニンからS-アデノシルメチオニンへの代謝反応を触媒するS-アデノシルメチオニン合成酵素をコードする metK は、必須遺伝子であることが示唆されている (Greene, R. C., Biosynthesis of

## [0006]

It is clear that an expression of the enzyme gene of the intrinsic biosynthesis path of L-methionine after reaction by the homoserine transsuccinylase receives the inhibition by the repressor which is metJ gene product, including metA. (Greene, R.C., Biosynthesis of Methionine. in "Escherichia coli and Salmonella Cellular and Molecular Biology/Second Edition", ed. Neidhardt, F. D., ASM Press, pp. 542-560 (1996).)。metJ gene is known to contact metBL operon which consists of the metB gene which codes the second enzyme cystathionine (gamma)-synthase of the intrinsic biosynthesis path to L-methionine, and metL which codes the aspartokinase - homoserine dehydrogenase II (AK-HDII), in a reverse direction adjacently (Duchange, N. et al., J. Biol. Chem. 258, 14868-14871 (1983))。

## [0007]

It is suggested that metK which codes the S-adenosylmethionine synthetase which catalyses metabolism reaction to the S-adenosylmethionine, from L-methionine is an essential gene. (Greene, R.C., Biosynthesis of Methionine. in "Escherichia coli and Salmonella Cellular and Molecular Biology/Second Edition",

Methionine. in "Escherichia coli and Salmonella Cellular and Molecular Biology/Second Edition", ed. Neidhardt, F. D., ASM Press, pp. 542-560 (1996)). また、metK の変異株は、DL-ノルロイシンやエチオニンなどのメチオニンアナログ耐性により得られることが知られているとともに (Chattopadhyay, M. K. et al., J. Gen. Microbiol. 137, 685-691 (1991))、L-メチオニンへの固有生合成経路の酵素の発現を上昇させることが報告されている (Greene, R. C. et al., J. Bacteriol. 115, 57-67 (1973)).

【0008】

【発明が解決しようとする課題】

上記のように、L-メチオニン生合成に関与する酵素やその遺伝子について、ある程度の報告はあるが、L-メチオニンの発酵生産に直接結びつく知見はほとんど得られておらず、L-メチオニン生産菌育種への応用もほとんどなされていない。

【0009】

本発明は、上記現状に鑑みなされたものであり、L-メチオニン生産に影響を与える因子を明らかにしてL-メチオニン生産菌を育種し、発酵法によるL-メチオニンの生産を可能とすることを課題とする。

【0010】

ed. Neidhardt, F. D., ASM Press, pp. 542-560 (1996)).

Moreover, DL-norleucine, the ethionine, etc. boiling the mutant of metK methionine analog resistant, and being obtained more is known (Chattopadhyay, M. K. et al., J. Gen. Microbiol. 137, 685-691 (1991)), and also raising an expression of the enzyme of the intrinsic biosynthesis path to L- methionine is reported (Greene, R. C. et al., J. Bacteriol. 115, 57-67 (1973)).

【0008】

【PROBLEM ADDRESSED】

As mentioned above, there is a certain amount of report about the enzyme which participates in L- methionine biosynthesis, or its gene.

However, almost all the findings directly connected with fermentation production of L- methionine are not obtained. Almost all application to L- methionine producing-microbe breeding is not made.

【0009】

This invention was made in view of the above present condition.

The factor which affects L- methionine production is clarified. The breeding of the L- methionine producing microbe is carried out. It aims at potentiating production of L- methionine by the fermentation method.

【0010】

**【課題を解決するための手段】**

本発明者らは、上記課題を解決するために鋭意検討を重ねた結果、本発明を完成するに至った。すなわち本発明は、以下のとおりである。

**【0011】**

(1) L-メチオニン生合成系のリプレッサーを欠損し、かつ、L-メチオニン生産能を有する微生物。

(2) 細胞内のホモセリントランスサクシニラーゼ活性が増強され、かつ、L-メチオニン生産能を有する微生物。

(3) L-メチオニン生合成系のリプレッサーを欠損し、細胞内のホモセリントランスサクシニラーゼ活性が増強され、かつ、L-メチオニン生産能を有する微生物。

**【0012】**

(4) さらに細胞内のS-アデノシルメチオニンシンテターゼ活性が弱化した前記(1)~(3)のいずれかの微生物。

(5) ホモセリントランスサクシニラーゼ活性の増強が、前記微生物細胞内のホモセリントランスサクシニラーゼをコードする遺伝子のコピー数を高めること、又は同遺伝子の発現調節配列を増強することによるものである(2)~(4)の微生物。

(6) L-メチオニンとS-アデノシルメチオニンによる協奏阻害が解除されたホモセリントランスサクシニラーゼを保持する(1)又は(4)に記載の微

**【SOLUTION OF THE INVENTION】**

The present inventors examined repeatedly zealously, in order to solve an above subject.

It came to perfect this invention as a result.

That is, this invention is as follows.

**【0011】**

(1)

Microorganisms which is defective in the repressor of L- methionine biosynthesis system, and, has L- methionine producing ability.

(2)

Microorganisms which intensifies an intracellular homoserine transsuccinylase activity and have L- methionine producing ability.

(3)

The microorganism which is defective in the repressor of L- methionine biosynthesis system, intensified in an intracellular homoserine transsuccinylase activity, and, has L- methionine producing ability.

**【0012】**

(4)

Furthermore one microorganisms of above-mentioned (1) - (3) which weakened the intracellular S-adenosylmethioine synthetase activity.

(5)

Intensification of a homoserine transsuccinylase activity is based by enhancing the number of copies of the gene which codes the above-mentioned microorganisms intracellular homoserine transsuccinylase, or by intensifying the expression control sequence of said gene. Microorganisms of (2)- (4).

(6)

Microorganisms given in (1) or (4) holding the homoserine transsuccinylase by which the concerned inhibition by L- methionine and the S-adenosylmethioine was released.

(7)

生物。

(7) L-スレオニン要求性を示すことを特徴とする(1)～(6)のいずれかの微生物。

(8) 細胞内のシスタチオニγγ-シンテース活性及びアスパルトキナーゼ-ホモセリンデヒドロゲナーゼII活性が増強された(1)～(7)のいずれかの微生物。

(9) エシエリヒア属に属することを特徴とする(1)～(8)のいずれかの微生物。

#### 【0013】

(10) 前記(1)～(10)のいずれかの微生物を培地に培養し、培地中にL-メチオニンを生成蓄積せしめ、これを該培地から採取することを特徴とするL-メチオニンの製造法。

#### 【0014】

(11) 配列番号26に示すアミノ酸配列において、27位のアルギニンがシステインに置換する変異、296位のイソロイシンがセリンに置換する変異、298位のプロリンがロイシンに置換する変異、27位のアルギニンがシステインに置換しかつ296位のイソロイシンがセリンに置換する変異、296位のイソロイシンがセリンに置換しかつ298位のプロリンがロイシンに置換する変異、298位のプロリンがロイシンに置換しかつ27位のアルギニンがシステインに置換する変異、又は、27位のアルギニンがシステインに置換し、296位のイソロイシンがセリンに置

L-threonine request property is shown.

One microorganisms of (1) - (6) which are characterized by the above-mentioned.

(8)

Microorganisms of either (1) - (7) with which the intracellular cystathionine (gamma)-synthase activity and the aspartokinase (-) homoserine dehydrogenase II activity were intensified.

(9)

It belongs to an Escherichia genus.

One microorganism of (1)- (8) characterized by the above-mentioned.

#### 【0013】

(10)

The microorganisms of either above-mentioned (1) - (10) are cultured to a medium.

In a medium, L- methionine is made to produce-accumulate and this is collected from this medium.

The manufacturing method of L- methionine characterized by the above-mentioned.

#### 【0014】

(11)

In the amino acid sequence shown in sequence number 26, it has the amino acid sequence which has the mutation which carries out an equivalent to any one of the

Mutation which arginine of the 27th position substitutes to cysteine, Mutation which isoleucine of the 296th position substitutes to serine, Mutation which the proline of the 298th position substitutes to a leucine, Mutation which arginine of the 27th position substitutes to cysteine, and isoleucine of the 296th position substitutes to serine, Mutation which isoleucine of the 296th position substitutes to serine, and the proline of the 298th position substitutes to a leucine, Mutation which the proline of the 298th position substitutes to a leucine, and arginine of the 27th position substitutes to cysteine, or, mutation which arginine of the 27th position

換しかつ298位のプロリンがロイシンに置換する変異のいずれかに相当する変異を有するアミノ酸配列を有し、L-メチオニンとS-アデノシルメチオニンによる協奏阻害が解除されたホモセリントランスサクシニラーゼをコードするDNA。

**【0015】**

本明細書において、S-アデノシルメチオニンを「SAM」、 $\alpha$ -メチル-DL-メチオニンを「MM」、DL-ノルロイシンを「NL」と呼ぶことがある。また、S-アデノシルメチオニンシンテターゼを「SAM合成酵素」、ホモセリントランスサクシニラーゼを「HTS」ということがある。また、E. coli の metB 遺伝子産物シスタチオニン $\gamma$ -シンテターゼを「シスタチオニン合成酵素」、metL 遺伝子産物「アスパルトキナーゼ-ホモセリンデヒドロゲナーゼ II」を AK-HDII と呼ぶことがある。

**【0016】**

本発明において「L-メチオニン生産能」とは、本発明の微生物を培地に培養したときに、培地中にL-メチオニンを蓄積する能力をいう。

**【0017】**

**【発明の実施の形態】**

以下、本発明を詳細に説明する。本発明の微生物は、L-メチオニン生合成系のリプレッサーを欠損し、かつ、L-メチオニン

substitutes to cysteine, and isoleucine of the 296th position substitutes to serine, and the proline of the 298th position substitutes to a leucine

DNA which codes the homoserine transsuccinylase by which the concerned inhibition by L- methionine and the S-adenosylmethioine was released.

**[0015]**

In this specification,

The S-adenosylmethioine may be called "SAM". (alpha)- methyl-DL-methionine may be called "MM". DL-norleucine may be called "NL".

Moreover, the S-adenosylmethioine synthetase may be called "SAM synthetase". The homoserine transsuccinylase may be called "HTS".

Moreover, the metB gene-product cystathionine (gamma)- synthase of E.coli may be called "cystathionine synthetase". metL gene product "the aspartokinaze (-) homoserine dehydrogenase II" may be called AK-HDII.

**[0016]**

In this invention, "L- methionine producing ability" means the capability which accumulates L- methionine in a medium, when culturing the microorganisms of this invention to a medium.

**[0017]**

**[Embodiment]**

Hereafter, this invention is demonstrated in detail.

Microorganisms of this invention, is microorganisms which is defective in the repressor of L- methionine biosynthesis system,

生産能を有する微生物、又は、細胞内のホモセリントランスサクシニラーゼ活性が増強され、かつ、L-メチオニン生産能を有する微生物である。本発明の微生物は、L-メチオニン生合成系のリプレッサーを欠損し、かつ、細胞内のホモセリントランスサクシニラーゼ活性が増強されていることが好ましい。さらに、本発明の微生物は、細胞中のSAM合成酵素活性が弱化していることが好ましい。

**[0018]**

上記のような微生物としては、L-ホモセリンからアシル転移反応により生じるO-アシルホモセリンを経てL-メチオニン及びSAMを産生する経路を有し、該アシル転移酵素の発現がリプレッサーによる抑制によって制御されるものであれば、特に制限されない。そのような微生物としては、エシェリヒア属細菌、コリネ型細菌、バチルス属細菌等の細菌が挙げられるが、エシェリヒア属細菌、例えばE. coliが好ましい。

**[0019]**

また、本発明の微生物は、E. coliのように、それが保持するHTSがL-メチオニン及びSAMによる協奏阻害を受けるものであれば、その阻害を解除することによって、L-メチオニン生産能を向上させることができる。

**[0020]**

メチオニン生合成の固有経路

and have L- methionine producing ability, Or, is the microorganisms which intensified an intracellular homoserine transsuccinylase activity and have L- methionine producing ability.

It is preferable that the microorganisms of this invention is defective in the repressor of L- methionine biosynthesis system, and intensified an intracellular homoserine transsuccinylase activity.

Furthermore, it is preferable that the microorganisms of this invention weakened SAM synthetase activity in a cell.

**[0018]**

As the above microorganisms, it has the path which produces L- methionine and SAM through O- acyl homoserine produced by acyl transfer reaction from L- homoserine. An expression of this acyl transferase is controlled by inhibition by the repressor. If it is the thing above, it will not limit particularly.

As such microorganisms, bacteria, such as Escherichia genus bacteria, coryneform bacteria, and Bacillus bacteria, are mentioned.

However, Escherichia genus bacteria, for example, E.coli is preferable.

**[0019]**

Moreover, the microorganisms of this invention can improve L- methionine producing ability by releasing the obstruction, if HTS which it holds receives the concerned inhibition by L- methionine and SAM like E.coli.

**[0020]**

As the intrinsic path of a methionine

は、E. coli 等多くの微生物のようにシスタチニオンを経由するものと、ブレビバクテリウム・フラバムのようにシスタチオンを経由しないものがある (Ozaki, H. et al., J. Biochem., 91, 1163, (1982)) が、本発明においては、シスタチニオンを経由する経路を有するものが好ましい。そのような微生物においては、細胞内のシスタチニン合成酵素活性を増強することにより、L-メチオニン合成能を強化することができる。なお、ブレビバクテリウム・フラバムのような微生物であっても、L-メチオニン生合成系のリプレッサーの欠損又は/及びHTSの増強によって、L-メチオニン生産能を高めることができる。

**【0021】**

さらに、上記微生物において、L-メチオニン生合成及びL-スレオニン生合成の共通経路に関与するアスパルトキナーゼ活性又はホモセリンデヒドロゲナーゼ活性の少なくとも一方を増強することによって、一層L-メチオニン生産能を高めることができる。

**【0022】**

上記の各特性の2以上を微生物に付与する場合、その順序は特に制限されず、任意の順序で付与することができる。また、複数の遺伝子を微生物に導入する場合、それらの遺伝子は同じベクターに搭載してもよく、複数の異なるベクターに別個に搭載

biosynthesis, that which goes through cystathionine like the many microorganisms such as E. coli, and that which do not go through the cystathionine like a Brevibacterium \* flavum are mentioned

(Ozaki, H. et al., J. Biochem., 91, 1163, (1982)). In this invention, that which has the path which goes through cystathionine is preferable.

In such microorganisms, L- methionine synthesis ability can be strengthened by intensifying an intracellular cystathionine synthetase activity.

In addition, even if it is the microorganisms like a Brevibacterium \* flavum, Intensification of deficient or/of the repressor of L- methionine biosynthesis system, and HTS can enhance L- methionine producing ability.

**[0021]**

Furthermore, in above microorganisms, the at least one of the aspartokinase activity which participates in the common path of L- methionine biosynthesis and L- threonine biosynthesis, or a homoserine dehydrogenase activity is intensified.

L- methionine producing ability can be enhanced much more.

**[0022]**

When providing to microorganisms two or more [ of each property of an above ], particularly the method is not limited. It can provide in arbitrary method.

Moreover, when introducing some genes to microorganisms, those genes may be mounted in the same vector. It may mount in the vector from which some differ, separately.

In addition, when using some vectors, it is

してもよい。尚、複数のベクターを用いる場合は、異なる薬剤マーカー、及び異なる複製起点を有するベクターを用いることが好ましい。以下に、上記の各特性を微生物に付与する方法を説明する。

#### 【0023】

<1> L-メチオニン生合成系のリプレッサーの欠損  
微生物のL-メチオニン生合成系のリプレッサーを欠損させるには、微生物に変異処理を施し、同リプレッサーを産生しなくなった株を選択することにより、行うことができる。変異処理は、微生物の変異株の取得に通常用いられている方法、例えば紫外線照射または N-メチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジン (NTG) もしくは亜硝酸等の突然変異に用いられている変異剤により行うことができる。

#### 【0024】

また、微生物の染色体DNA上の前記リプレッサーをコードする遺伝子を破壊することによっても、同リプレッサーを欠損させることができる。遺伝子の破壊は、コード領域又は発現調節配列の少なくとも一部を欠失した欠失型遺伝子を作製し、該欠失型遺伝子と染色体上の遺伝子との相同組換えを起こさせ、染色体上の遺伝子を欠失型遺伝子で置換することによって行うことができる (遺伝子置換)。

#### 【0025】

リプレッサー遺伝子は、例えば、

preferable to use the vector which has a different medicine marker and a different replication starting point.

Below, the method to provide each property of an above to microorganisms is demonstrated.

#### [0023]

<1>

The repressor of L- methionine biosynthesis system is deficient.

In order to make the repressor of L- methionine biosynthesis system of microorganisms suffer a loss, a mutation process is performed to microorganisms.

It can carry out by selecting the strain which stopped producing said repressor.

A mutation process can be performed by the method generally used for acquisition of the mutant of microorganisms. For example, the mutation agent used for mutation, such as a ultraviolet irradiation, an N-methyl- N'- nitro- N-nitrosoguanidine (NTG), or nitrous acid, can perform.

#### [0024]

Moreover, said repressor can be made to suffer a loss also by destroying the gene which codes the above-mentioned repressor on chromosome DNA of microorganisms.

A destruction of a gene produces the deletion type gene which deleted at least one part of a coding region or an expression control sequence.

The homologous recombination of this defective gene and the gene on a chromosome is made to generate.

It can carry out by substituting the gene on a chromosome with the defective gene (gene substitution).

#### [0025]

As for the repressor gene, for example, the



E. coli の L-メチオニン生合成系のリプレッサーをコードする遺伝子 (metJ) の塩基配列は知られているので (Duchange, N. et al., J. Biol. Chem. 258, 14868-14871 (1983))、該塩基配列に基づいて作製したプライマーを用いた PCR により、染色体 DNA から単離することができる。こうして得られる遺伝子断片から一定の領域を制限酵素により切り出し、コード領域又は発現調節領域の少なくとも一部を欠失させることによって、欠失型遺伝子を作製することができる。

**【0026】**

遺伝子置換は、例えば次のようにして行うことができる。温度感受性複製起点を有するベクターに欠失型遺伝子を搭載させて組換えベクターを調製し、同組換えベクターで微生物を形質転換し、欠失型遺伝子と染色体 DNA 上の遺伝子との相同組換えにより染色体 DNA 上の遺伝子に欠失型遺伝子を挿入させる。その後、形質転換株を前記ベクターが複製できない温度で培養し、細胞質中のベクターを脱落させる。さらに、染色体上の 1 コピーの遺伝子をベクターとともに脱落させることにより、遺伝子が置換される。目的の遺伝子置換が生じていることは、遺伝子置換株の染色体 DNA をサザン・ハイブリダイゼーションにより解析することにより、確認することができる。

**【0027】**

base sequence of the gene (metJ) which codes the repressor of L- methionine biosynthesis system of E.coli is known (Duchange, N.etal., J.Biol.Chem.258, 14868-14871:(1983), By PCR using the primer produced based on this base sequence, it can isolate from chromosome DNA.

In this way a constant region is cut out by the restriction enzyme from the gene fragment obtained. By making the at least one part of a coding region or an expression tone control region delete, the deletion type gene is producible.

**[0026]**

A gene substitution can be done as follows, for example.

The vector which has a temperature-sensitivity replication starting point is made to mount the deletion type gene, and a recombinant vector is prepared. Microorganisms are transformed by said recombinant vector.

The deletion type gene is made to insert in the gene on chromosome DNA by the homologous recombination of the deletion type gene and the gene on chromosome DNA.

It cultures after that at the temperature to which the above-mentioned vector cannot reproduce the transformant, and the vector in a cytoplasm is omitted.

Furthermore, it substitutes a gene by omitting the gene of one copy on a chromosome with a vector.

It can confirm that the target gene substitution is generated by analyzing chromosome DNA of a gene-substitution strain by southern \* hybridization.

**[0027]**

E. coli 用の温度感受性複製起点を有するベクターとしては、例えば特願平9-194603号に記載のプラスミド pMAN997 等が、また、コリネ型細菌用の温度感受性複製起点を有するベクターとしては、例えば特開平5-7491号公報に記載のプラスミド pHSC4 等が挙げられるが、これらに限定されず、他のベクターを用いることもできる。

**[0028]**

前述したように E. coli では、metJ 遺伝子は、metB 遺伝子と metL 遺伝子とからなる metBL オペロンと、逆向きに隣接していることが知られている (Duchange, N. et al., J. Biol. Chem. 258, 14868-14871 (1983))。したがって、欠失型 metJ 遺伝子に、適当なプロモーター配列を連結し、上記と同様に遺伝子置換を行うことによって、metJ 遺伝子の破壊と、metBL オペロンのプロモーター置換による発現改善とを、一度の相同組換えによって行うことができる。metBL オペロンの発現が向上すると、細胞内のシスタチオニン合成酵素活性及び AK-HDII 活性が増強される。

**[0029]**

具体的には、E. coli、例えば W3110 株染色体 DNA を鋳型とし、配列番号5及び配列番号6記載の塩基配列を有するオリゴヌクレオチドをプライマーとする PCR 反応 (polymerase chain reaction; White, T.J. et

As the vector which has a temperature-sensitivity replication starting point for E. coli, For example, the plasmid pMAN997 indicated by Japanese-Patent-Application-No. 9-194603 is mentioned. Moreover, it uses as the vector which has a temperature-sensitivity replication starting point for coryneform bacteria, for example, the plasmid pHSC4 of a description etc. is mentioned to Unexamined-Japanese-Patent 5-7491 gazette.

However, it is not limited to these but the other vector can also be used.

**[0028]**

As mentioned above, in E.coli, it is known that metJ gene is adjacent with metBL operon which consists of a metB gene and a metL gene in a reverse direction (Duchange, N.etal., J.Biol.Chem.258, 14868-14871 (1983)).

Therefore, a suitable promoter sequence is connected with a deletion type metJ gene. By doing a gene substitution like an above, a homologous recombination can do once a destruction of metJ gene, and the expression improvement by the promoter substitution of metBL operon.

An improvement in an expression of metBL operon intensifies an intracellular cystathionine synthetase activity and an AK-HDII activity.

**[0029]**

Specifically, E.coli, for example, 3110 strain chromosome DNA of W, is made into a cast. The fragment of about 1 kb containing metB gene obtained by PCR reaction which makes a primer the oligonucleotide which has the base sequence of sequence number 5 and sequence number 6 (polymerase chain reaction; White, T.J. et

al ;Trends Genet., 5,185(1989))  
により得られる metB 遺伝子を含  
む約 1 kb の断片と、配列番号 7  
及び配列番号 8 に記載の塩基配  
列を有するオリゴヌクレオチドを  
プライマーとする PCR 反応によ  
り得られる metJ 遺伝子の下流部  
分を含む約 1 kb の断片と、配列  
番号 9 及び配列番号 10 に示す  
オリゴヌクレオチドをアニールし  
て得られるスレオニンオペロンの  
プロモーター配列を有する配列の  
三者を、適当なベクターに挿入し  
て連結することによって、metJ の  
構造遺伝子が欠失し、metBL オペ  
ロンのプロモーターがスレオニン  
プロモーターに置換した構造を有  
する DNA 断片を含む組換えベク  
ターを得ることができる。

#### 【0030】

上記のようにして調製した組換  
えベクターを微生物に導入する  
には、これまでに報告されてい  
る形質転換法に従って行えばよ  
い。例えば、エシェリヒア・コ  
リ K-12 について報告されてい  
るような、受容菌細胞を塩化  
カルシウムで処理して DNA の  
透過性を増す方法 (Mandel, M.  
et al., J. Mol. Biol., 53,  
159(1970)) があり、バチルス・  
ズブチリスについて報告されて  
いるような、増殖段階の細胞か  
らコンピテントセルを調製して  
DNA を導入する方法  
(Duncan, C. H. et al., Gene, 1,  
153 (1977)) がある。あるいは、  
バチルス・ズブチリス、放線菌  
類及び酵母について知られてい  
るような、DNA 受容菌の細胞

Genet., 5,185(1989))

, the fragment of about 1 kb containing the  
down-stream part of metJ gene obtained by  
PCR reaction which makes a primer the  
oligonucleotide which has the base sequence of  
sequence number 7 and sequence number 8,  
and the sequence which has the promoter  
sequence of the threonine operon obtained by  
annealing the oligonucleotide shown in  
sequence number 9 and sequence number 10,  
are inserted in a suitable vector. It is connected.  
The recombinant vector containing the DNA  
fragment which has the structure which the  
structural gene of metJ deleted and the  
promoter of metBL operon substituted for the  
threonine promoter can be obtained.

#### [0030]

In order to introduce to microorganisms the  
recombinant vector prepared as mentioned  
above, what is sufficient is just to carry out  
according to the transforming method reported  
until now.

For example, there is a method (Mandel,  
M.etal., J.Mol.Biol., 53,159 (1970)) of  
processing the acceptance bacteria cell which  
is reported about the Escherichia \* coli K-12, by  
calcium chloride, and increasing the  
permeability of DNA.

There is the method (Duncan, C.H. et al.,  
Gene, 1,153 (1977)) of preparing a competent  
cell from the cell of the proliferation step which  
is reported about the Bacillus \* subtilis, and  
introducing DNA.

Or, the cell of the DNA acceptance bacteria  
which are known about a Bacillus \* subtilis,  
Actinomyces, and yeast is changed into the  
condition of the protoplast which receives the  
recombinant DNA easily, or a spheroplast. The  
method of introducing the recombinant DNA to  
the DNA acceptance bacteria can also be

を、組換えDNAを容易に取り込むプロトプラストまたはスフェロプラストの状態にして組換えDNAをDNA受容菌に導入する方法 (Chang, S. et al., Molec. Gen. Genet., 168, 111 (1979); Bibb, M. J. et al., Nature, 274, 398 (1978); Hinnen, A. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 75 1929 (1978)) も応用できる。また、コリネ型細菌の形質転換は、電気パルス法 (特開平2-207791号公報参照) によって行うことができる。

## 【0031】

metJ、metBL、あるいは後述のmetA、metK及びthrBC等の各遺伝子のクローニング等に用いるベクターとしては、例えばE. coli 細胞内で自律複製可能なプラスミド、具体的には pUC19、pUC18、pBR322、pHSG299、pHSG399、pHSG398、RSF1010等が挙げられる。また、ファージベクターを用いてもよい。E. coli 以外の微生物を用いる場合は、同微生物及びE. coli において自律複製可能なシャトルベクターを用いることが好ましい。例えば、コリネ型細菌で自律複製可能なプラスミドとしては、以下のものが挙げられる。

## 【0032】

pAM 330 特開昭5  
8-67699号公報参照  
pHM 1519 特開昭  
58-77895号公報参照  
pAJ 655 特開昭  
58-192900号公報参照

applied.

(Chang, S. et al., Molec. Gen. Genet., 168, 111 (1979); Bibb, M. J. et al., Nature, 274, 398 (1978); Hinnen, A. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 75 1929 (1978))

Moreover, it can do transforming of coryneform bacteria by the electric pulse method (see Unexamined Japanese Patent 2-207791 gazette).

## 【0031】

As the vector used for a cloning of each gene such as metJ, metBL or below-mentioned metA, metK, and thrBC, for example, the plasmid whose autonomous reproduction can be carried out by E. coli intracellular is mentioned. pUC19, pUC18, pBR322, pHSG299, pHSG399, pHSG398, RSF1010, etc. are mentioned specifically.

Moreover, a phage vector may be used.

E. When using microorganisms except coli, it is preferable to use the shuttle vector whose autonomous reproduction can be carried out in said microorganisms and E. coli.

For example, the following are mentioned as a plasmid which can carry out autonomous reproduction with coryneform bacteria.

## 【0032】

pAM 330 see Unexamined-  
Japanese-Patent 58-67699 gazette.  
pHM 1519 see Unexamined-  
Japanese-Patent 58-77895 gazette.  
pAJ 655 see Unexamined-  
Japanese-Patent 58-192900 gazette.  
pAJ 611 Same as the  
above

p A J	6 1 1	pAJ	1844	Same as the
同 上		above		
p A J	1 8 4 4	pCG	1	see Unexamined-
同 上		Japanese-Patent 57-134500		gazette.
p C G	1	pCG	2	see Unexamined-
5 7 - 1 3 4 5 0 0 号公報参照	特開昭	Japanese-Patent 58-35197		gazette.
p C G	2	pCG	4	see Unexamined-
5 8 - 3 5 1 9 7 号公報参照	特開昭	Japanese-Patent 57-183799		gazette.
p C G	4	pCG	11	Same as the
5 7 - 1 8 3 7 9 9 号公報参照	特開昭	above		
p C G	1 1	pHK4		see Unexamined-
同 上		Japanese-Patent 5-7491		gazette.
p H K 4	特開平			
5 - 7 4 9 1 号公報参照				

## 【0033】

遺伝子断片とベクターを連結して組み換えDNAを調製するには、遺伝子断片の末端に合うような制限酵素でベクターを切断する。連結は、T4 DNAリガーゼ等のリガーゼを用いて行うのが普通であるその他、染色体DNAの調製、染色体DNAライブラリーの作製、ハイブリダイゼーション、PCR、プラスミドDNAの調製、DNAの切断及び連結、形質転換、プライマーとして用いるオリゴヌクレオチドの設定等の方法は、当業者によく知られている通常の方法を採用することができる。これらの方法は、Sambrook, J. et al., "Molecular Cloning A Laboratory Manual, Second Edition", Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)等に記載されている。

## 【0034】

<2> HTS活性の増強、及び変異型HTSの付与

## [0033]

In order to connect and rearrange a gene fragment and a vector and to prepare DNA, A vector is cut by the restriction enzyme which suits the end of a gene fragment.

It is an average to do a connection using ligase, such as T4DNA ligase. In addition, methods, such as preparation of preparation of chromosome DNA, production of a chromosome DNA library, hybridization, PCR, and plasmid DNA, disconnection of DNA and a connection, transforming, and a setup of the oligonucleotide used as a primer, the usual method well known by the expert is employable.

These methods are indicated by Sambrook, J.etal., "MolecularCloningALaboratoryManual and SecondEdition", ColdSpringHarborLaboratoryPress (1989), etc.

## [0034]

<2>

Intensification of HTS activity, and providing of a variant HTS

微生物細胞内のHTS活性は、前記微生物細胞内のHTSをコードする遺伝子断片を、同微生物で機能するベクター、好ましくはマルチコピー型のベクターと連結して組み換えDNAを複製し、これを前記微生物に導入して形質転換すればよい。形質転換株の細胞内のHTSをコードする遺伝子のコピー数が上昇する結果、HTS活性が増強される。E. coli では、HTSはmetA 遺伝子にコードされている。微生物としてエシェリヒア属細菌を用いる場合、導入するHTS遺伝子は、エシェリヒア属細菌由来の遺伝子を用いることが好ましいが、ホモセリントランスアセチラーゼを有するコリネ型細菌等の他の微生物由来の遺伝子を使用することもできる。

#### 【0035】

HTS活性の増強は、HTS遺伝子を微生物宿主の染色体DNA上に多コピー存在させることによっても達成できる。コリネバクテリウム属細菌に属する微生物の染色体DNA上にHTS遺伝子を多コピーで導入するには、染色体DNA上に多コピー存在する配列を標的に利用して相同組換えにより行う。染色体DNA上に多コピー存在する配列としては、レペティブDNA、転移因子の端部に存在するインバーティッド・リピートが利用できる。あるいは、特開平2-109985号公報に開示されているように、HTS遺伝子をトランスポゾンに搭載して

Microorganisms intracellular HTS activity, the gene fragment which codes the above-mentioned microorganisms intracellular HTS is connected with the vector (preferably multi copy type vector) which functions by said microorganisms, and recombination DNA is produced.

What is sufficient is just to introduce this to the above-mentioned microorganisms and to transform it.

The number of copies of the gene which codes intracellular HTS of the transformant rises.

As a result, HTS activity is intensified.

HTS is coded by metA gene in E. coli.

When using Escherichia genus bacteria as microorganisms, as for HTS gene to introduce, it is preferable to use an Escherichia genus bacteria -deriving gene.

However, the other microorganisms -deriving genes, such as the coryneform bacteria which have the homoserine trans acetylase, can also be used.

#### [0035]

Intensification of HTS activity can be realized also by carrying out the multi-copy presence of the HTS gene on chromosome DNA of a microorganisms host.

In order to introduce HTS gene by many copies on chromosome DNA of the microorganisms belonging to Corynebacterium genus bacteria, a homologous recombination does to a target using the sequence which carries out a multi-copy presence on chromosome DNA.

As a sequence which carries out a multi-copy presence on chromosome DNA, repetitive DNA and the inverted \* repeat which exists in the tip of the transfer factor can be utilized.

Or, as disclosed by Unexamined Japanese Patent 2- 109985 gazette, HTS gene is mounted in a transposon. This can be transferred and multi-copy introduction can also be carried out on chromosome DNA.

これを転移させて染色体DNA上に多コピー導入することも可能である。いずれの方法によっても形質転換株内のHTS遺伝子のコピー数が上昇する結果、HTS活性が増強される。

**【0036】**

HTS活性の増強は、上記の遺伝子増強による以外に、HTS遺伝子の発現調節配列を増強することによっても達成される。具体的には、染色体DNA上又はプラスミド上のHTS遺伝子のプロモーター等の発現調節配列を強力なものに置換する（特開平1-215280号公報参照）。たとえば、lacプロモーター、trpプロモーター、trcプロモーター、tacプロモーター、ラムダファージのP<sub>R</sub>プロモーター、P<sub>L</sub>プロモーター等が強力なプロモーターとして知られている。これらのプロモーターへの置換により、HTS遺伝子の発現が強化されることによってHTS活性が増強される。

**【0037】**

E. coliのHTS遺伝子 (metA) は、その塩基配列が知られているので (Blattner, F. R. et al., Science, 277, 1453-1462 (1997))、該塩基配列に基づいて作製したプライマーを用いたPCRにより、染色体DNAから単離することができる。そのようなプライマーとして具体的には、配列番号21及び配列番号22に示す塩基配列を有するオリゴヌクレオチドが挙げられ

The number of copies of HTS gene in the transformant rises also by the any method.

As a result, HTS activity is intensified.

**[0036]**

Intensification of HTS activity is realized also by intensifying the expression control sequence of HTS gene besides being based on gene intensification of an above.

Specifically, expression control sequences, such as the promoter of HTS gene on chromosome DNA or a plasmid, are substituted to a strong thing. (Refer Unexamined-Japanese-Patent 1-215280 gazette).

For example, lac promoter, trp promoter, trc promoter, tac promoter, PR promoter of a lambda phage, PL promoter, etc. are known as a strong promoter.

Therefore, an expression of HTS gene is strengthened by substitution to promoter towards of these. HTS activity is intensified.

**[0037]**

As for HTS gene (metA) of E. coli, the base sequence is known (Blattner, F.R. et al., Science277, 1453-1462 (1997)). By PCR using the primer produced based on this base sequence, it can isolate from chromosome DNA.

The oligonucleotide which has the base sequence shown in sequence number 21 and sequence number 22 is specifically mentioned as such a primer.

る。

### 【0038】

上記のようにして微生物細胞内のHTS活性を増強することによって、L-メチオニン生合成が強化され、L-メチオニンの生成量を増加させることができる。と考えられる。

### 【0039】

また、HTSは、L-メチオニンとSAMによる協奏的阻害を受けるので、この協奏阻害が解除されたHTSを微生物に保持させることによって、L-メチオニン生合成系を強化することができる。前記協奏阻害が解除されたHTSを微生物に保持させることは、微生物に変異処理を施し、同協奏阻害が解除されたHTSを産生する株を選択することにより、行うことができる。変異処理は、微生物の変異株の取得に通常用いられている方法、例えば紫外線照射またはN-メチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジン (NTG) もしくは亜硝酸等の突然変異に用いられている変異剤により行うことができる。ここで、「L-メチオニンとSAMによる協奏阻害を解除されたHTS」とは、L-メチオニン及びSAMの非存在下における酵素活性に対するL-メチオニンもしくはSAM、又はL-メチオニン及びSAMの存在下での酵素活性の比(残存率)が、野生型HTSのそれよりも高いHTSをいう。具体的には、例えば、1 mMのL-メチオニン存在下での残

### [0038]

L- methionine biosynthesis is strengthened by intensifying a microorganisms intracellular HTS activity as mentioned above.

It is considered that it can make the amount of production of L- methionine increase.

### [0039]

Moreover, HTS receives the concerted obstruction by L- methionine and SAM.

Therefore L- methionine biosynthesis system can be strengthened also by making HTS by which this concerned\_inhibition was released hold to microorganisms.

Holding HTS in which the above-mentioned concerned\_inhibition was released in microorganisms is performed by performing a mutation process to microorganisms, and selecting the strain which produces HTS in which said concerned\_inhibition was released.

A mutation process can be done by the method generally used for acquisition of the mutant of microorganisms. For example, the mutation agent used for mutation, such as a ultraviolet irradiation, an N-methyl- N'- nitro- N-nitrosoguanidine (NTG), or nitrous acid, can do.

Here, "HTS released the concerned\_inhibition by L- methionine and SAM", the ratio (persistence) of enzyme activity says HTS of L- methionine and L- methionine with respect to enzyme activity in the nonexistence of SAM, SAM or L- methionine, and SAM higher than that of a wild type HTS in the presence of.

Specifically, For example, the persistence in L- methionine presence of 1 mM is 40 % or more, preferably 80 % or more.

The persistence in SAM presence of 1 mM is 10 % or more (preferably 50 % or more). Or, L- methionine of 0.1 mM and the activity under a presence of SAM are respectively 15 % or more, preferably 60 % or more. This HTS is HTS which released in the concerned\_inhibition



存率が40%以上、好ましくは80%以上、1mMのSAM存在下での残存率が10%以上、好ましくは50%以上、又は、それぞれ0.1mMのL-メチオニン及びSAMの存在下での活性が15%以上、好ましくは60%以上であるHTSは、L-メチオニンとSAMによる協奏阻害を解除されたHTSである。

**【0040】**

上記のような変異型HTSを保持する変異株は、親株を $\alpha$ -メチル-DL-メチオニン (MM) 存在下で、例えば1g/lのMMを含む培地で培養し、生育する株を選択することにより、取得することができる。MMによる選択は、複数回繰り返してもよい。

**【0041】**

変異型HTSを保持する変異株は、上記のようにして得られるHTS変異株から変異型HTS遺伝子(変異型 metA)をクローニングし、同変異型遺伝子で微生物を形質転換することによっても、取得することができる。変異型HTS遺伝子の単離、及び同遺伝子の微生物への導入は、前記の野生型HTS遺伝子と同様にして行うことができる。変異型 metA 遺伝子として具体的には、配列番号26に示すアミノ酸配列において、27位のアルギニンがシステインに置換する変異、296位のイソロイシンがセリンに置換する変異、又は298位のプロリンがロイシンに置換する変異のいずれかに

by L- methionine and SAM.

**[0040]**

The mutant holding the above variants HTS, a parent strain is cultured for example, in the presence of (alpha)- methyl-DL-methionine (MM) in the medium containing MM of 1 g/l.

By selecting the strain to grow, it is acquirable.

The choice by MM may be repeated two or more times.

**[0041]**

The mutant holding a variant HTS clones a variant HTS gene (variant metA) from HTS mutant obtained as mentioned above.

Also by transforming microorganisms with said variant gene, it is acquirable.

An isolation of a variant HTS gene and the introduction to the microorganisms of said gene can be done like the above-mentioned wild-type HTS gene.

As a variant metA gene, specifically in the amino acid sequence shown in sequence number 26, HTS which has the mutation which carries out an equivalent to any one of the

Mutation which arginine of the 27th position substitutes to cysteine, Mutation which isoleucine of the 296th position substitutes to serine, Or mutation which the proline of the 298th position substitutes to a leucine is mentioned.

Moreover, HTS which has 2 or 3 sorts of these arbitrary mutations is also the preferable variant HTS.

相当する変異を有するHTSが挙げられる。また、これらの変異の任意の2種又は3種を有するHTSも、好ましい変異型HTSである。

**【0042】****<3> SAM合成酵素活性の弱  
化**

さらに、細胞内のSAM合成酵素活性を弱化させることにより、微生物のL-メチオニン生産能を上昇させることができる。SAM合成酵素活性を欠損させることによっても、微生物のL-メチオニン生産能を上昇させることができるが、その場合は微生物を培養する培地にSAMを含有させる必要があるので、SAM合成酵素活性を弱化させることが好ましい。ここで、「SAM合成酵素活性を弱化させる」とは、微生物細胞タンパク質当たりのSAM合成酵素の比活性が、野生型SAM合成酵素を保持する株よりも低いことをいう。具体的には、弱化の程度は、野生株のSAM合成酵素に比べて80~50%、好ましくは50~30%、より好ましくは30~10%程度が挙げられる。E. coliでは、SAM合成酵素の比活性が10%より低下すると、細胞分裂が阻害されることが示唆されている (Newman, E. B. et al., J. Bacteriol., 180, 3614-3619 (1998))。

**【0043】**

SAM合成酵素活性が弱化した微生物は、酵素タンパク質当た

**[0042]****<3>****Weakness-izing of SAM synthetase activity**

Furthermore, L- methionine producing ability of microorganisms can be risen by making an intracellular SAM synthetase activity weaken.

L- methionine producing ability of microorganisms can be risen also by making SAM synthetase activity defective.

However, the medium which cultures microorganisms in that case needs to be made to contain SAM.

Therefore it is preferable to make SAM synthetase activity weaken.

"SAM synthetase activity is made to weaken" here means that the specific activity of SAM synthetase per microorganisms cell protein is lower than the strain holding a wild-type SAM synthetase.

Specifically, compared with SAM synthetase of a wild strain, as for the degree of weakness-izing, 80-50% (preferably 50-30%, more preferable about 30-10%) is mentioned.

E. In coli, if the specific activity of SAM synthetase reduces from 10%, it is suggested that the cell division is obstructed (Newman, E.B.etal., J.Bacteriol., 180, 3614-3619 (1998)).

**[0043]**

The microorganisms which SAM synthetase activity weakened may produce SAM

りの比活性が低下したSAM合成酵素(弱化型SAM合成酵素)を産生するものであってもよいし、SAM合成酵素遺伝子の転写効率又は翻訳効率が低下したことにより、酵素の発現効率が低下したものであってもよい。

**【0044】**

SAM合成酵素活性が弱化した変異株は、親株をDL-ノルロイシン(NL)存在下で、例えば0.1g/lのNLを含む培地で培養し、生育する株を選択することにより、取得することができる。NLによる選択は、複数回繰り返してもよい。また、DL-ノルロイシンの代わりにエチオニン又はγ-グルタミルメチルエステルを用いることも可能である。

**【0045】**

弱化型SAM合成酵素を保持する変異株は、上記のようにして得られるSAM合成酵素弱化株から弱化型SAM合成酵素遺伝子をクローニングし、同変異型遺伝子で微生物染色体上の野生型SAM合成酵素遺伝子を置換することによっても、取得することができる。SAM合成酵素遺伝子の遺伝子置換は、前記のmetJ遺伝子と同様にして行うことができる。E. coliのSAM合成酵素遺伝子(metK)は、その塩基配列が知られているので(Blattner, F. R. et al., Science, 277, 1453-1462 (1997))、該塩基配列に基づいて作製したプライマーを用いたPCRにより、染色体DNAから単離すること

synthetase (weakness-izing type SAM synthetase) to which the specific activity per enzyme protein reduced. When the transcription efficiency or the translation efficiency of SAM synthetase gene reduced, that to which the expression efficiency of an enzyme reduced may be used.

**[0044]**

The mutant which SAM synthetase activity weakened is obtained as follows. a parent strain is cultured for example, in the medium containing NL of 0.1 g/l, in the presence of DL-norleucine (NL).

By selecting the strain to grow, it is acquirable.

The choice by NL may be repeated two or more times.

Moreover, the ethionine or (gamma)- glutamyl methyl ester can also be used instead of DL-norleucine.

**[0045]**

The mutant holding a weakness-izing type SAM synthetase is obtained as follows. A weakness-izing type SAM synthetase gene is cloned from SAM synthetase-weaken strain obtained as mentioned above.

The wild-type SAM synthetase gene on a microorganisms chromosome is substituted with said variant gene.

The gene substitution of SAM synthetase gene can be done like the above-mentioned metJ gene.

As for SAM synthetase gene (metK) of E. coli, the base sequence is known (Blattner and F.R. et al., Science 277, 1453-1462(1997)). By PCR using the primer produced based on this base sequence, it can isolate from chromosome DNA.

The oligonucleotide which has the base sequence shown in sequence number 11 and sequence number 12 is specifically mentioned as such a primer.

Mutation is generated in obtained metK gene.

ができる。そのようなプライマーとして具体的には、配列番号 11 及び配列番号 12 に示す塩基配列を有するオリゴヌクレオチドが挙げられる。得られた metK 遺伝子に変異が生じていることは、該遺伝子の塩基配列を決定し、公知の野生型 metK 遺伝子の塩基配列と比較することにより、確認することができる。

**【0046】**

弱化型 SAM 合成酵素をコードする遺伝子として具体的には、配列番号 18 に示すアミノ酸配列において、303 番目のイソロイシンがロイシンに置換する変異、185 番目のバリンがグルタミン酸に置換する変異、378 番目のアルギニン以降がアラニン-メチオニン-ロイシン-プロリン-バリン（配列番号 29）からなる配列に変化する変異のいずれかに相当する変異を有する SAM 合成酵素が挙げられる。

**【0047】**

<4> L-スレオニン要求性  
微生物に L-スレオニン要求性を付与することにより、L-メチオニン生産能を向上させることができる。L-スレオニン要求性を示す微生物として具体的には、L-ホモセリンから L-スレオニンに至る L-スレオニン生合成の固有経路に関与する酵素にいずれかが欠損した微生物が挙げられる。E. coli においては、L-スレオニンの生合成に関与する酵素の遺伝子は、ス

This can be confirmed by determining the base sequence of this gene and comparing with the base sequence of a well-known wild-type metK gene.

**[0046]**

As the gene which codes a weakened SAM synthetase, specifically in the amino acid sequence shown in sequence number 18, SAM synthetase which has the mutation which carries out an equivalent to any one of the Mutation which the 303rd isoleucine substitutes to a leucine, Mutation which the 185th valine substitutes to glutamic acid, Mutation which changes to the sequence which the 378th arginine or later becomes from alanine- methionine- leucine - proline - valine (sequence number 29) is mentioned.

**[0047]**

<4>  
L- threonine requirement property  
L- methionine producing ability can be improved by providing L- threonine request property to microorganisms.  
As the microorganisms which show L- threonine requirement, the microorganisms defective in any one enzymes which participates in the intrinsic path of L- threonine biosynthesis that it leads in L- threonine, from L- homoserine specifically suffered a loss are mentioned.  
In E. coli, the gene of the enzyme which participates in the biosynthesis of L- threonine exists as threonine operon (thrABC).

レオニンオペロン (thrABC) として存在し、thrBC 部分を欠失させることによって L-ホモセリン以降の生合成能を失った L-スレオニン要求株を取得することができる。尚、thrA 遺伝子は L-メチオニン及び L-スレオニンの共通経路の酵素であるアスパルトキナーゼのアイソザイムの一つをコードしており、欠失させないことが好ましい。

**[0048]**

thrBC を欠失させるには、染色体 DNA 上のスレオニンオペロン中の thrBC 部分を破壊すればよい。thrBC の破壊は、一部を欠失した thrBC で微生物染色体上の thrBC 部分を置換することによって行うことができる。thrBC の遺伝子置換は、前記 metJ 遺伝子の遺伝子置換と同様に行えばよい。欠失を含む thrBC は、E. coli 染色体 DNA を鋳型とし、配列番号 1 及び 2 に示す塩基配列を有するプライマーを用いて PCR により thrB 遺伝子の上流部分を含む約 1 kb の断片を増幅し、同様に配列番号 3 及び 4 に示す塩基配列を有するプライマーを用いて PCR により thrC 遺伝子の下流部分を含む約 1 kb の断片を増幅し、これらの増幅断片を連結することによって取得することができる。

**[0049]**

<5> L-メチオニンの製造  
上記のようにして得られる L-メチオニン生産能を有する微生物を培地に培養し、該培地中に

L- threonine request strain which lost the biosynthesis ability after L- homoserine is acquirable by making thrBC part delete. In addition, thrA gene codes one of the isozymes of the aspartokinase which is the enzyme of the common path of L- methionine and L- threonine.

It is preferable not to make it delete.

**[0048]**

What is sufficient is just to destroy thrBC part in the threonine operon on chromosome DNA, in order to make thrBC delete.

A destruction of thrBC can be done by substituting thrBC part on a microorganisms chromosome by thrBC which deleted the part.

What is sufficient is just to do the gene substitution of thrBC like the gene substitution of the above-mentioned metJ gene.

thrBC containing deletion uses E.coli chromosome DNA as a template.

The fragment of about 1 kb which contains the upper part of thrB gene by PCR using the primer which has the base sequence shown in sequence number 1 and 2 is amplified.

The fragment of about 1 kb which contains the down-stream part of thrC gene by PCR using the primer which has the base sequence similarly shown in sequence number 3 and 4 is amplified.

It is acquirable by connecting these amplification fragments.

**[0049]**

<5>

Manufacture of L- methionine

The microorganisms which have L- methionine producing ability obtained as mentioned above are cultured to a medium. The

L-メチオニンを生産蓄積せしめ、これを該培地から採取することにより、L-メチオニンを製造することができる。

production and accumulation of L- methionine is carried out into this medium. L- methionine can be produced by collecting this from this medium.

#### 【0050】

使用する培地は、微生物に応じて従来より用いられてきた周知の培地を用いてかまわない。つまり、炭素源、窒素源、無機イオン及び必要に応じその他の有機成分を含有する通常の培地である。本発明を実施するための特別な培地は必要とされない。

#### [0050]

The well-known medium conventionally used depending on microorganisms may be used for the medium to use.

In other words, it is the usual medium which contains the other organic component depending on the source of a carbon, the source of nitrogen, an inorganic ion, and the need.

The special medium for implementing this invention is not needed.

#### 【0051】

炭素源としては、グルコース、ラクトース、ガラクトース、フラクトースやでんぷんの加水分解物などの糖類、グリセロールやソルビトールなどのアルコール類、フマル酸、クエン酸、コハク酸等の有機酸類等を用いることができる。

#### [0051]

As a source of a carbon, saccharides, such as a glucose, a lactose, galactose, a fructose, and the hydrolyzate of starch, alcohols, such as a glycerol and sorbitol organic acids, such as a fumaric acid, a citric acid, and a succinic acid, can be used.

#### 【0052】

窒素源としては、硫酸アンモニウム、塩化アンモニウム、リン酸アンモニウム等の無機アンモニウム塩、大豆加水分解物などの有機窒素、アンモニアガス、アンモニア水等を用いることができる。

#### [0052]

As a source of nitrogen, organic nitrogen, such as inorganic ammonium salts, such as ammonium sulfate, ammonium chloride, and an ammonium phosphate, and a soybean hydrolyzate, ammonia gas, aqueous ammonia, etc. can be used.

#### 【0053】

有機微量栄養源としては、ビタミンB1、L-スレオニン、L-チロシンなどの要求物質または酵母エキスを適量含有させることが望ましい。これらの他に、必要に応じて、リン酸カリ

#### [0053]

As a source of an organic micronutrient, it is desirable to carry out containing of a required substance or yeast extract, such as a thiamine, L- threonine, and L- tyrosine, in a suitable amount.

Other than these, potassium phosphate, magnesium sulfate, an iron ion, the manganese

ウム、硫酸マグネシウム、鉄イオン、マンガンイオン等が少量添加される。

**【0054】**

培養は、利用される微生物に応じて従来より用いられてきた周知の条件で行ってかまわない。例えば、好氣的条件下で16～120時間培養を実施するのがよく、培養温度は25℃～45℃に、培養中pHは5～8に制御する。尚、pH調整には無機あるいは有機の酸性あるいはアルカリ性物質、更にアンモニアガス等を使用することができる。

**【0055】**

培養終了後の培地液からのL-メチオニンの採取は、本願発明において特別な方法が必要とされることはない。すなわち、本発明は従来より周知となっているイオン交換樹脂法、沈澱法その他の方法を組み合わせることにより実施できる。

**【0056】****【実施例】**

以下、本発明を実施例によりさらに具体的に説明する。

**【0057】****【実施例1】**

エシェリヒア・コリ W3110 株からのL-スレオニン要求株及びmetJ欠損株の取得  
<1>欠失を有するthrBC構造

ion, etc. is added in a small amount depending on the need.

**[0054]**

Incubation may be done on condition that common knowledge conventionally used depending on the microorganisms utilized.

For example, it is good to implement incubation for 16 to 120 hours on aerobic conditions. Incubation temperature is controlled to 25 degrees-Celsius - 45 degrees-Celsius, and pH is controlled to 5-8 in incubation.

In addition, acidity or an alkaline substance inorganic to pH adjustment, or organic.

Furthermore ammonia gas etc. can be used.

**[0055]**

As for collection of L- methionine from the medium liquid after the incubation completion, a special method is not needed in this invention.

That is, this invention can be implemented by combining the ion-exchange-resin method which is that it is well-known conventionally, and the method of precipitation-method others.

**[0056]****[Example]**

Hereafter, an Example even specifically demonstrates this invention.

**[0057]****[Example 1]**

Acquisition of metJ defective strain and L-threonine request strain from 3110 strain of Escherichia \* coli W  
<1>

遺伝子を含む組換え用プラスミドの調製

ゲノム DNA 精製キット (アドバンスドジェネティクテクノロジー社製) を用い、その指示に従って E. coli の野生型 K-12 株の誘導体である W3110 株から染色体 DNA を調製した。配列表の配列番号 1 及び配列番号 2 に記載の塩基配列を有するオリゴヌクレオチドを合成した。これをプライマーとし、前記染色体 DNA を鋳型として、エルリッチらの方法 (PCR Technology-Principles and Applications for DNA Amplification, ed. Erlich, H. A., Stockton Press) に従って、PCR 反応を行い、thrB 遺伝子の上流部分を含む約 1 kb の断片の増幅を行った。この増幅断片は、両端にプライマーに由来する EcoRI 及び Sall の認識配列が導入されている。得られた増幅断片を、導入した認識部位を切断する制限酵素で切断した。

#### 【0058】

同様に、配列番号 3 及び配列表番号 4 に記載の塩基配列を有するオリゴヌクレオチドをプライマーとして PCR 反応を行い、thrC 遺伝子の下流部分を含む約 1 kb の断片の増幅を行った。この増幅断片は、両端にプライマーに由来する Sall 及び HindIII の認識配列が導入されている。得られた増幅断片を、導入した認識部位を切断する制限酵素で切断した。上記 2 つの増幅断片と、pHSG398 (宝酒造社製) と

Preparation of the plasmid for being recombinant containing thrBC structural gene which has deletion

A genome DNA purification kit (made in an advanced Genetic technology company) is used. According to the indication, 3110 strain of W to chromosome DNA which is the derivative of K-12 strain of the wild types of E.coli was prepared.

The oligonucleotide which has the base sequence of sequence number 1 of a sequence table and sequence number 2 was synthesized. This is used as a primer.

the above-mentioned chromosome DNA is made into a template. PCR reaction is done according to the method of Erlich at a. (H. PCR Technology-Principles and Applications for DNA Amplification, ed. Erlich, A., Stockton Press). The fragment of about 1 kb containing the upper part of thrB gene was amplified.

The recognition sequence of EcoRI and Sall to which this amplification fragment originates in a primer to both ends is introduced.

It cut by the restriction enzyme which cuts the recognizing site which introduced the obtained amplification fragment.

#### 【0058】

PCR reaction is done, using as a primer similarly the oligonucleotide which has the base sequence of sequence number 3 and the sequence-table number 4. The fragment of about 1 kb containing the down-stream part of thrC gene was amplified.

The recognition sequence of Sall and HindIII to which this amplification fragment originates in a primer to both ends is introduced.

It cut by the restriction enzyme which cuts the recognizing site which introduced the obtained amplification fragment.

The amplification fragment of the above two and pHSG398 (made in a Takara-Shuzo company) cut by EcoRI and HindIII are connected using a ligation kit (Takara Shuzo).



を、ライゲーションキット（宝酒造）を用いて連結し、E. coli JM109 コンピテントセル（宝酒造）を形質転換した。形質転換体からプラスミドを、プラスミド抽出機 PI-50（倉敷紡績社製）を用いてアルカリ法（Boirnboim, H. C. et al., Nucleic Acids Res., 7, 1513-1523 (1979)）に基づいて調製した。得られた組換えプラスミドから、EcoRI 及び HindIII 認識部位に 2 つの断片が Sall 認識部位を介して挿入されたプラスミドを、挿入断片の長さによって選択した。このプラスミドは、thrBC の構造遺伝子の上流と下流を含んでおり、thrBC の構造遺伝子のほぼ全長が欠失した遺伝子断片を含んでいる。

#### 【0059】

< 2 > 遺伝子組換えによる thrBC 構造遺伝子欠損株の作製  
上記プラスミドと、特願平 9-194603 号に記載の温度感受性複製起点を有するプラスミド pMAN997 を、EcoRI 及び HindIII で切断した後、これらを連結し、得られた組換えプラスミドで E. coli JM109 株を形質転換した。形質転換体からプラスミドを抽出し、pMAN997 に thrBC 欠失遺伝子断片が挿入された構造を有するものを選択し、pMAN $\Delta$ BC とした。このプラスミドを用いて W3110 株を形質転換し、常法に従って遺伝子組換えを行った。すなわち、組換え株の選択は、M9 培地（Sambrook, J. et al., "Molecular Cloning A

E. coli JM109 competent cell (Takara Shuzo) was transformed.

The plasmid was prepared from the transformed body based on the alkaline process (using plasmid extractor PI-50 (made in the Kurabo Industries Ltd. company)) (Boirnboim, H.C.etal., NucleicAcidsRes., 7, 1513-1523 (1979)).

The plasmid by which the fragment of two was inserted in EcoRI and HindIII recognizing site through Sall recognizing site was selected from the obtained recombinant plasmid with the length of an insert.

This plasmid contains the upstream and the downstream of a structural gene of thrBC, and contains the gene fragment of the structural gene of thrBC in which the full length is almost defective.

#### [0059]

<2>

Production of thrBC structure gene lacking strain twisted gene recombinant

The above plasmid, and the plasmid pMAN997 which has the temperature-sensitivity replication starting point indicated by Japanese-Patent-Application-No. 9-194603, are cut by EcoRI and HindIII. These are connected. 109 strain of E.coliJMs was transformed by the obtained recombinant plasmid.

A plasmid is extracted from a transformed body.

That which has the structure where thrBC deletion gene fragment was inserted in pMAN997 is selected. It was referred to as pMAN(DELTA)BC.

3110 strain of W is transformed using this plasmid.

The gene recombination was done according to the conventional method.

That is, L- threonine request property in M9 medium (Sambrook, J.etal., "MolecularCloningALaboratoryManual/SecondEdition",

Laboratory Manual/Second Edition", Cold Spring Harbor Laboratory Press, A.3 (1989))  
におけるL-スレオニン要求性によって行い、得られたL-スレオニン要求株を W $\Delta$ BC 株とした。

**[0060]**

<3> W3110 株及び W $\Delta$ BC 株からの metJ 欠損株の作製  
次に、W3110 株染色体 DNA を鋳型とし、配列番号 5 及び配列番号 6 記載の塩基配列を有するオリゴヌクレオチドをプライマーとして PCR 反応を行い、metB 遺伝子を含む約 1 kb の断片の増幅を行った。この増幅断片は、両端に EcoRI 及び SphI の認識配列が導入されている。得られた増幅断片を、導入した認識部位を切断する制限酵素で切断した。

**[0061]**

同様に配列番号 7 及び配列番号 8 に記載の塩基配列を有するオリゴヌクレオチドをプライマーとして PCR 反応を行い、metJ 遺伝子の下流部分を含む約 1 kb の断片の増幅を行った。この増幅断片は、両端に HindIII 及び EcoRI の認識配列が導入されている。得られた増幅断片を、導入した認識部位を切断する制限酵素で切断した。

**[0062]**

次に、配列番号 9 に示した、両端に SphI 及び HindIII 認識部位を有し、スレオニンオペロンのプロモーター配列を有する配列

ColdSpringHarborLaboratoryPress, A.3 (1989))  
does a choice of a recombinant strain. Obtained L- threonine request strain was made into W(Delta) BCstrain.

**[0060]**

<3>

Production of 3110 strain of W, and metJ defective strain from W(Delta) BCstrain  
Next, let 3110 strain chromosome DNA of W be a template.

PCR reaction is done, using the oligonucleotide which has the base sequence of sequence number 5 and sequence number 6 as a primer. The fragment of about 1 kb containing metB gene was amplified.

As for this amplification fragment, the recognition sequence of EcoRI and SphI is introduced by both ends.

It cut by the restriction enzyme which cuts the recognizing site which introduced the obtained amplification fragment.

**[0061]**

PCR reaction is done, using the oligonucleotide which has similarly the base sequence of sequence number 7 and sequence number 8 as a primer. The fragment of about 1 kb containing the down-stream part of metJ gene was amplified.

As for this amplification fragment, the recognition sequence of HindIII and EcoRI is introduced by both ends.

It cut by the restriction enzyme which cuts the recognizing site which introduced the obtained amplification fragment.

**[0062]**

Next, the sequence which was shown in sequence number 9 and which has SphI and HindIII recognizing site to both ends, and has the promoter sequence of the threonine operon is synthesized with complementary strand

を、配列番号 10 に示した相補鎖とともに合成し、これらをアニールさせた後に、制限酵素 SphI 及び HindIII で切断した。このようにして得たスレオニンプロモーター断片と、EcoRI で切断した pHSG298 (宝酒造社製) と、前記 2 つの PCR 増幅断片とを混合した後、連結反応を行った。この連結反応液で、JM109 株を形質転換し、形質転換体からプラスミドを抽出した。得られた組換えプラスミドから、4 者が連結されたプラスミドを選択した。このプラスミドは、metJ の構造遺伝子が欠失し、metBL オペロンのプロモーターがスレオニンプロモーターに置き換わった構造を有している。

**【0063】**

上記で得られたプラスミド、及び特願平 9-194603 号に記載の温度感受性複製起点を有するプラスミド pMAN997 を EcoRI で切断し、ライゲーションを行い、pMAN997 に metJ 欠失断片が挿入された構造を有するものを選択し、pMAN $\Delta$ J とした。このプラスミドを用いて W3110 株及び W $\Delta$ BC 株を形質転換し、常法に従って遺伝子組換えを行った。得られた組換え株は、菌体から調製した DNA を鋳型とし、配列番号 6 及び配列番号 8 に示したオリゴヌクレオチドをプライマーとした PCR 法による増幅産物の長さで選択した。W3110 株及び W $\Delta$ BC 株から得られた metJ 欠失株を、それぞれ W $\Delta$ J 株及び W $\Delta$ BC

shown in sequence number 10.

After making these anneal, it cut by restriction enzymes SphI and HindIII.

The ligation was done after mixing the threonine promoter fragment thus obtained, pHSG298 (made in a Takara-Shuzo company) cut by EcoRI, and The two PCR amplification fragments above-mentioned.

109 strain of JMs is transformed by this connection reaction solution.

The plasmid was extracted from the transformed body.

The plasmid with which four persons were connected was selected from the obtained recombinant plasmid.

The structural gene of metJ deletes this plasmid.

The promoter of metBL operon replaced the threonine promoter. It has this structure.

**[0063]**

The plasmid obtained by the above and the plasmid pMAN997 which has the temperature-sensitivity replication starting point of a description Japanese-Patent-Application-No. 9-194603 are cut with EcoRI.

Ligation is done. That which has the structure where metJ deletion fragment was inserted in pMAN997 is selected. It was referred to as pMAN(DELTA) J.

W3110 strain and W(DELTA) BC strain are transformed using this plasmid. The gene recombination was done according to the conventional method.

The obtained recombinant strain uses DNA prepared from the biomass as a template.

The oligonucleotide shown in sequence number 6 and sequence number 8 was selected by the length of the amplified production by the PCR method made into the primer.

metJ deletion strain obtained from W3110 strain, and W(DELTA) BC strain, was respectively made to W (DELTA) J strain, and

ΔJ株とした。

W(DELTA) BC(DELTA) J strain.

【0064】

組換えによる metJ 欠失の効果を確認するため、菌体から粗酵素抽出液を調製し、HTS及びシスタチオニン合成酵素の活性を測定した。W3110株とWΔJ株を2mlのLB培地に植菌し、37℃で一晩培養した。この培養液1mlを5,000rpmで10分間遠心分離し、菌体を0.9%の食塩水で2度洗浄した。得られた菌体を1mlの0.9%食塩水に懸濁し、そのうちの0.5mlを、50mlの5mMのL-メチオニンを含むデイビスーミンジオリ最少培地(Davis, B. D., and Mingioli, E. S., J. Bacteriol. 60, 17-28 (1950))に植菌した。これを37℃で24時間培養し、培養液を8,000rpmで10分間遠心分離し、菌体を0.9%食塩水で2度洗浄した。菌体を3mlの1mMジチオスレイトールを含む50mMリン酸カリウムバッファー(pH7.5)に懸濁した。この懸濁液を超音波破碎機(久保田社製)を用いて、4℃にて150Wで5分間細胞破碎処理を行った。破碎液を15,000rpmで30分間遠心処理した上清をセファデックス G-50 カラム(ファルマシア社製)にて脱塩処理したものを粗酵素抽出液とした。粗酵素抽出液中のHTS活性とシスタチオニン合成酵素の活性を測定した。

【0065】

HTS活性は、粗酵素抽出液 5 μl を 0.1M リン酸カリウム

【0064】

In order to confirm the effect of metJ deletion by recombination, a crude-enzyme extract is prepared from a biomass. The activity of HTS and a cystathionine synthetase was measured. 3110 strain of W and J strain (DELTA) of W are inoculated to 2 ml LB medium.

Night incubation was carried out by 37 degrees-Celsius.

1 ml of 10 minutes of this culture solution is centrifuged by 5,000 rpm.

The biomass was twice washed by 0.9% of salt solution.

The obtained biomass is suspended to 1 ml 0.9% salt solution.

0.5 ml of it was inoculated to the day bis-Mingioli minimal medium (Davis, B. D., and Mingioli, E. S., J. Bacteriol. 60, 17-28 (1950)) containing 50 ml L- methionine of 5 mM.

This is cultured for 24 hours by 37 degrees-Celsius.

10 minutes of culture solutions are centrifuged by 8,000 rpm.

The biomass was twice washed by salt solution 0.9%.

The biomass was suspended to 50 mM potassium-phosphate buffer (pH7.5) containing 3 ml 1 mM dithiothreitol.

The 5 minute cell crushing process was done this suspension by 4 degrees-Celsius 150W using the ultrasonic crusher (made in Kubota company).

The 30 minute centrifugation process of the crushing liquid was carried out by 15,000 rpm. The desalting process of this supernatant liquid was carried out in G-sephadex 50 column (product made from Pharmacia K.K.). This was made into the crude-enzyme extract.

HTS activity in a crude-enzyme extract and the activity of a cystathionine synthetase were measured.

【0065】

As for HTS activity, 5 micro-l of crude-enzyme extracts is added to the reaction solution which

(pH7.5)、1 mM サクシニルコエンザイム A (シグマ社製)、0.2nM DL-[<sup>14</sup>C]ホモセリン (室町化学工業社製)、及び 0.2mM L-ホモセリンからなる反応液に加えて 50  $\mu$ l とし、30°C で 10 分間反応を行った。反応液 1  $\mu$ l を、セルロースプレート (メルク社製) にスポットし、アセトン、ブタノール、水、ジエチルアミンを 10 : 10 : 5 : 2 の割合で含む添加溶媒で展開した。プレートを風乾した後、イメージアナライザー (富士写真工業社製) にてオートラジオグラフィを行った。

#### 【0066】

シスタチオン合成酵素は、L-システイン非存在下ではO-サクシニルホモセリンを  $\alpha$ -ケト酪酸、アンモニア及びコハク酸を生じることが知られており、簡便な検出方法として利用できる (Holbrook, E. L. et al., Biochemistry 29,435-442 (1990))。粗酵素抽出液 100  $\mu$ l を、0.2M トリス-塩酸 (pH8)、5mM O-サクシニルホモセリン (シグマ社製)、及び 0.25mM ピリドキサルリン酸 (シグマ社製) からなる反応液に加え 1ml とし、37°C で 20 分間反応を行った後氷冷した。この反応液中のO-サクシニルホモセリンを逆相 HPLC (ジーエルサイエンス社製) で定量し、粗酵素抽出液非添加の反応液から減少したO-サクシニルホモセリン量を算出した。ピリドキサルリン酸非添加の反応を同時に行い、ピリドキサルリン酸依存のO-

consists of 0.1M potassium phosphate (pH7.5), 1 mM succinyl coenzyme A (made in a sigma company), a 0.2nMDL-[<sup>14</sup>C] homoserine (made in a Muromachi chemical-industry company), and a 0.2 mM L-homoserine. It may be adjusted to 50 micro-l.

10 minute reaction was done by 30 degrees-Celsius.

The spot of 1 micro-l of the reaction solution is carried out to a cellulose plate (made in a Merck company). It developed by the addition solvent which contains acetone, a butanol, water, and a diethylamine at ratio of 10:10:5:2.

After carrying out the air drying of the plate, the image analyzer (made in the Fuji photograph industrial company) did autoradiography.

#### [0066]

It is known that a cystathionine synthetase will produce O- succinyl homoserine ( $\alpha$ )- keto butyric acid, ammonia, and a succinic acid in L-cysteine nonexistence. It can utilize as the simple detection method (Holbrook, E.L.etal., Biochemistry29,435-442 (1990)).

It adds to the reaction solution which consists of 0.2M tris- hydrochloric acid (pH8), a 5 mM O-succinyl homoserine (made in a sigma company), and 0.25 mM pyridoxal phosphoric acid (made in a sigma company) in 100 micro-l of crude-enzyme extracts. It may be 1 ml.

It froze, after doing 20 minute reaction by 37 degrees-Celsius.

O- succinyl homoserine in this reaction solution is assayed by the reverse phase HPLC (made in GL science company).

The amount of O- succinyl homoserines reduced from crude-enzyme extract non-adding reaction solution was calculated.

It reacts pyridoxal phosphoric-acid un-adding simultaneously. O- succinyl homoserine reduction of pyridoxal phosphoric-acid dependence was made into the cystathionine synthetase activity.

サクシニルホモセリン減少を、シスタチオニン合成酵素活性とした。

## 【0067】

上記のようにして測定したHTS活性とシスタチオニン合成酵素のそれぞれの比活性の測定結果を表1に示した。HTS活性はW3110株ではL-メチオニン添加の効果によりほとんど検出されないが、WΔJ株においては顕著な活性を示した。シスタチオニン合成酵素活性も、WΔJ株においてはW3110株に比して顕著な増大が認められた。これらの結果から組換えによるmetJ欠失とmetBLオペロンのプロモーター置換の効果が確認された。

## [0067]

The measurement result of HTS activity measured as mentioned above and each specific activity of a cystathionine synthetase was shown in Table 1.

HTS activity is almost undetectable by the effect of L- methionine addition at 3110 strain of W.

However, the remarkable activity was shown in J strain (DELTA) of W.

As for cystathionine synthetase activity, in J strain W (DELTA), remarkable increase observed as compared with 3110 strain of W.

From these results, the effect of metJ deletion by recombination and the promoter substitution of metBL operon was confirmed.

## 【0068】

## [0068]

## 【表1】

## [Table 1]

表1：metJ欠損株におけるHTS活性及びシスタチオン合成酵素活性

菌株	HTS活性 (mmol/min/mg蛋白質)	シスタチオン合成酵素活性 (mmol/min/mg蛋白質)
W3110	0.3	140
WΔJ	126	1300

HTS activity and cystathionine synthetase activity in metJ defective strain  
Strain, HTS activity (protein), Cystathionine synthetase activity (protein)

【0069】

## 【実施例2】

W3110株からの metK 変異株の取得

W3110 株を LB 培地 (Sambrook, J. et al., "Molecular Cloning A Laboratory Manual/Second Edition", Cold Spring Harbor Laboratory Press, A.1 (1989)) にて 37℃で一晩培養した。培養した培養液 1 ml を 5,000rpm で 10 分間遠心分離し、菌体を 0.9%の食塩水で 2 度洗浄した。得られた菌体を 100  $\mu$ l の 0.9% 食塩水に懸濁し、そのうちの 10  $\mu$ l を 5 ml の 0.1g/l の DL-ノルロイシン (NL) を含むデイビス-ミンジオリ最少培地に植菌した。これを 37℃で 5 日間培養した。

【0070】

生育してきたコロニーの幾つかを LB 寒天培地上でコロニー分離し、再度 0.1g/l の NL を含むデイビス-ミンジオリ最小培地での生育を確認し、12 株の NL 耐性株を選抜した。これらの耐性株から染色体 DNA を調製した。これを鋳型として配列番号 11 及び 12 に示す配列を有する 2 種のプライマーを用いて PCR 反応を行い metK 遺伝子の増幅を行った。この増幅断片の塩基配列を、配列番号 11 及び 12 に示した増幅用プライマー、及び配列番号 13、14、15、及び 16 に示す配列を有

[0069]

## [Example 2]

Acquisition of metK mutant from W 3110 strain  
In LB medium (Sambrook, J.etal., "MolecularCloningALaboratoryManual/SecondEdition", ColdSpringHarborLaboratoryPress, A.1 (1989)), W3110 strain was cultured at 37 degrees-Celsius overnight.

1 ml of the cultured culture solutions is centrifuged by 5,000 rpm 10 minutes.

The biomass was twice washed by 0.9% of salt solution.

The obtained biomass is suspended to 100-micro-l 0.9% salt solution.

Ten micro-l of it were inoculated to the day bis- Mingioli minimal medium containing DL-norleucine (NL) of 5 ml 0.1 g/l.

This was cultured for 5 days by 37 degrees-Celsius.

[0070]

The colony isolation of some of the grown colony is carried out on LB agar medium. Growth by the day bis- Mingioli minimum medium which contains NL of 0.1 g/l again is confirmed.

12 strain NL resistant strain was selected.

Chromosome DNA was prepared from these resistant strains.

This is made into a template. PCR reaction is done using 2 sorts of primers which have the sequence shown in sequence number 11 and 12. metK gene was amplified.

It determined using the primer for amplification which showed the base sequence of this amplification fragment to sequence number 11 and 12, and the primer which has the sequence which shows sequence number 13, 14, 15, and 16.

Determination of a base sequence was done

するプライマーを用いて決定した。塩基配列の決定はダイターミネーターサイクルシーケンシングキット（パーキンエルマー社製）を用いて、373S型DNAシーケンサー（パーキンエルマー社製）にてそれぞれの指示に従って行った。対照として決定した野生株 W3110 の塩基配列はブラットナーらが報告している metK の配列 (Blattner, F. R. et al., Science, 277, 1453-1462 (1997)) と完全に一致した。この配列を配列番号 17 に示した。また、この配列がコードし得る SAM 合成酵素のアミノ酸配列を配列番号 18 に示した。

#### 【0071】

NL 耐性株のうち、metK の構造遺伝子中に変異点が見いだされたものは 12 株の内 3 株あり、これらを WNL2、WNL24、及び WNL32 と名付けた。これらの変異株の metK 塩基配列は、配列番号 17 に示す野生型の塩基配列上で、WNL2 株では 907 番目のアデニンがシトシンに、WNL24 株では 554 番目のチミンがアデニンに、WNL32 株では 1132 番目のシトシン塩基の欠失が認められた。この結果、配列番号 18 に示した SAM 合成酵素のアミノ酸配列において、WNL2 株の SAM 合成酵素は 303 番目のイソロイシンがロイシンに、WNL24 株では 185 番目のバリンがグルタミン酸に、WNL32 株では 1 塩基欠失によって 378 番目のアルギニン以降がアラニン-メチオニン-ロイシン-プロリ

by the 373S model DNA sequencer (product made from Perkin-Elmer corporation) according to each indication using the terminator cycle sequencing kit (product made from Perkin-Elmer corporation).

The base sequence of the wild strain W3110 determined as a control, it corresponded completely with the sequence of metK which Blattner et al. has reported (Blattner, F. R. et al., Science, 277, 1453-1462 (1997))

This sequence was shown in sequence number 17.

Moreover, the amino acid sequence of SAM synthetase which this sequence can code was shown in sequence number 18.

#### 【0071】

That where the mutating point was found out in the structural gene of metK among NL resistant strains, is three of 12 strain strain.

These were named WNL2, WNL24, and WNL32.

By WNL2 strain, deletion of a base was observed the 907th adenine in cytosine on the base sequence of the wild type which shows metK base sequence of these mutants to sequence number 17. In WNL24 strain, deletion of the adenine is observed the 554th thymine. In WNL32 strain, deletion of a base was observed in the 1132nd cytosine.

As this result, in the amino acid sequence of SAM synthetase shown in sequence number 18, as for SAM synthetase of WNL2 strain, the 303rd isoleucine is changing to a leucine. In WNL24 strain, the 185th valine is changing to glutamic acid. In WNL32 strain, the 378th arginine or later is changing to the sequence which consists of alanine- methionine- leucine- proline - valine with 1 base deletion. This became evident.

It was estimated that SAM synthetase activity is weakening these strains.



シーバリンからなる配列に変化していることが明らかとなった。これらの株はSAM合成酵素活性が弱化していることが推定された。

【0072】

## 【実施例3】

metK 変異の導入と野生型 metA 遺伝子の増幅による L-メチオニン生産

(1) W $\Delta$ BC $\Delta$ J 株への metK 変異の導入

metK 遺伝子変異株である WNL2 株、WNL24 株、及び WNL32 株の染色体 DNA を鋳型とし、配列番号 19 及び配列番号 20 記載のオリゴヌクレオチドをプライマーとして PCR 反応を行い、metK 遺伝子を含む約 2.5kb の断片の増幅を行った。この増幅断片は両端に HindIII の認識配列が導入されている。得られた増幅断片をそれぞれ HindIII で切断した。HindIII で切断した pSTV28 (宝酒造社製) 及び PCR 増幅断片を混合後連結反応を行い、JM109 株を形質転換した。形質転換体からプラスミドを抽出した。得られた組換えプラスミドから PCR 増幅断片が挿入されたプラスミドを選択した。これらのプラスミドは metK の構造遺伝子に変異を有していることを塩基配列を決定し確認した。

【0073】

これらのプラスミドの HindIII 切断断片を、HindIII で切断した

[0072]

## [Example 3]

L- methionine production by introduction of metK mutation, and amplification of a wild-type metA gene

(1)

Introduction of metK mutation to W(Delta) BC(Delta) J strain

The chromosome DNA (WNL2strain which is metK genetic-variation strain, WNL24strain, and WNL32 strain) are made into a template. PCR reaction is done, using the oligonucleotide of sequence number 19 and sequence number 20 as a primer. The fragment of about 2.5 kbs containing metK gene was amplified.

As for this amplification fragment, the recognition sequence of HindIII is introduced by both ends.

The obtained amplification fragment was respectively cut by HindIII.

The ligation after mixing is done pSTV28 (made in the Takara-Shuzo company) and PCR amplification fragment which were cut by HindIII. 109 strain of JMs was transformed.

The plasmid was extracted from the transformed body.

The plasmid in which PCR amplification fragment was inserted was selected from the obtained recombinant plasmid.

These plasmids have mutation in the structural gene of metK. This was confirmed (determining a base sequence).

[0073]

HindIII disconnection fragment of these plasmids is cloned to pMAN997 cut by HindIII. pMANK-2, pMANK-24, and pMANK-32 were

pMAN997 にクローニングし、それぞれ pMANK-2, pMANK-24, pMANK-32 と名付けた。これらのプラスミドを用いて W  $\Delta$ BC  $\Delta$ J 株を形質転換し、常法に従って遺伝子組換えを行った。組換え株から染色体 DNA を抽出して鋳型とし、配列番号 11 及び配列番号 12 に示したオリゴヌクレオチドをプライマーとした PCR 法による増幅産物の塩基配列を調べた。それぞれの変異が認められたものを選択した。得られた W  $\Delta$ BC  $\Delta$ J 株由来の metK 変異株をそれぞれ W  $\Delta$ BC  $\Delta$ JK-2 株、W  $\Delta$ BC  $\Delta$ JK-24 株、及び W  $\Delta$ BC  $\Delta$ JK-32 株とした。

#### 【0074】

##### (2) metA 遺伝子の増幅

W3110 株染色体 DNA を鋳型とし、配列番号 21 及び配列番号 22 記載の配列を有するオリゴヌクレオチドをプライマーとして PCR 反応を行い、metA 遺伝子を含む約 1 kb の断片の増幅を行った。この増幅断片は両端にそれぞれ SphI 及び Sall の認識配列が導入されている。得られた増幅断片を、導入した認識部位を切断する制限酵素で切断した。これを SphI 及び Sall で切断した pHSG398 にクローニングした。挿入断片の塩基配列を配列番号 21 及び 22 に示した増幅用プライマー、並びに配列番号 23 及び 24 に示す配列を有するプライマーを用いて決定した。決定した野生株 W3110 の metA の塩基配列はブラットナーらが報告している

respectively named.

J strain (DELTA) of W(DELTA) BCs is transformed using these plasmids. The gene recombination was done according to the conventional method.

Chromosome DNA is extracted from a recombinant strain and it considers as a template.

The base sequence of the amplified production by the PCR method which made the primer the oligonucleotide shown in sequence number 11 and sequence number 12 was investigated.

What each mutation was observed to was selected.

The obtained W(DELTA)BC(DELTA)J strain - deriving metK mutant was respectively made into W(DELTA)BC(DELTA)JK-2strain, W(DELTA)BC(DELTA)JK-24strain, and W(DELTA)BC(DELTA)JK-32strain.

#### [0074]

##### (2)

##### Amplification of metA gene

Let 3110 strain chromosome DNA of W be a template.

PCR reaction is done, using the oligonucleotide which has the sequence of sequence number 21 and sequence number 22 as a primer. The fragment of about 1 kb containing metA gene was amplified.

As for this amplification fragment, the recognition sequence of SphI and Sall is respectively introduced by both ends.

It cut by the restriction enzyme which cuts the recognizing site which introduced the obtained amplification fragment.

This was cloned to pHSG398 cut by SphI and Sall.

It determined using the primer for amplification which showed the base sequence of an insert to sequence number 21 and 22, and the primer which has the sequence which shows sequence number 23 and 24.

The base sequence of metA of the determined wild strain W3110 corresponded completely with the sequence (Blattner, F.R.

metA の配列 (Blattner, F. R. et al., Science, 277, 1453-1462 (1997)) と完全に一致した。この配列を配列番号 25 に示した。また、この配列がコードし得る HTS のアミノ酸配列を配列番号 26 に示した。

etal., Science277, 1453-1462 (1997)) of metA which Blattner et al. has reported.

This sequence was shown in sequence number 25.

Moreover, the amino acid sequence of HTS which this sequence can code was shown in sequence number 26.

#### 【0075】

このプラスミドの SphI 及び Sall による切断物、実施例 1 に記載のスレオニンプロモーターの HindIII 及び SphI による切断物、及び HindIII 及び Sall で切断した pMW118 (日本ジーン社製) を混合後、連結反応を行った。この反応液で JM109 株を形質転換し、形質転換体からプラスミドを抽出した。得られた組換えプラスミドから 3 者が連結されたプラスミドを選択した。このプラスミドはスレオニンプロモーターの下流に metA 遺伝子が配置されており、スレオニンプロモーターにより metA が発現する構造をとっている。このプラスミドを pMWPthmetA-W と名付けた。このプラスミドを用いて W3110 株、W $\Delta$ BC 株、W $\Delta$ BC $\Delta$ J 株、W $\Delta$ BC $\Delta$ JK-2 株、W $\Delta$ BC $\Delta$ JK-24 株、及び W $\Delta$ BC $\Delta$ JK-32 株を形質転換し、形質転換体を得た。

#### [0075]

The ligation was done after mixing the cut article by SphI and Sall of this plasmid, the cut article by HindIII and SphI of the threonine promoter of Example 1, and pMW118 (made in a Japanese gene company) cut by HindIII and Sall.

109 strain of JMs is transformed by this reaction solution.

The plasmid was extracted from the transformed body.

The plasmid with which three persons were connected was selected from the obtained recombinant plasmid.

This plasmid takes the structure in which metA gene is arranged on a threonine promoter's downstream. metA expresses by the threonine promoter.

This plasmid was named pMWPthmetA-W.

W3110strain, W(DELTA)BCstrain, W(DELTA)BC(DELTA)Jstrain, W(DELTA)BC(DELTA)JK-2strain, W(DELTA)BC(DELTA)JK-24strain, and W(DELTA)BC(DELTA)JK-32 strain are transformed using this plasmid. The transformed body was obtained.

#### 【0076】

各形質転換体を 50mg/l のアンピシリンを含む LB プレート上、37°C で一晚培養した。菌体をグルコース 40g/l、硫酸マグネシウム 1g/l、硫安 16g/l、リン酸二水素カリウム 1 g/l、酵母抽出物 (Bacto Yeast-Extract (Difco))

#### [0076]

Each transformed body was cultured by 37 degrees-Celsius on LB plate containing a 50-mg/l ampicillin overnight.

A biomass is inoculated to 20 ml of the mediums of pH7 containing glucose 40 g/l, magnesium-sulfate 1 g/l, ammonium-sulfate 16 g/l, potassium-dihydrogenphosphate 1 g/l, yeast extract (BactoYeast-Extract (Difco)) 2 g/l,

2g/l、硫酸マンガン 0.01g/l、硫酸鉄 0.01g/l、炭酸カルシウム 30g/l、アンピシリン 50mg/l、L-スレオニン 0.5g/l を含む pH7 の培地 20ml に植菌し、37℃で 48 時間培養した。

#### 【0077】

培養物から菌体を除き、アミノ酸分析計（日立社製）にて L-メチオニン量を測定した。この結果を表 3 に示した。W3110 株では認められなかった L-メチオニンが、W $\Delta$ BC 株、W $\Delta$ BC $\Delta$ J 株において増加した。metK の変異は、W $\Delta$ BC $\Delta$ JK-2 株では L-メチオニン量は低下したものの、W $\Delta$ BC $\Delta$ JK-32 株においては同等、W $\Delta$ BC $\Delta$ JK-24 株では上昇が認められ、L-メチオニン生産に効果が認められた。プラスミド pMWPthrmA-W を保持した W $\Delta$ BC $\Delta$ JK-24 株は、プライベートナンバー AJ13425 が付与され、平成 10 年 5 月 14 日より、通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所（郵便番号 305-8566 日本国茨城県つくば市東一丁目 1 番 3 号）に寄託されており、受託番号 FERM P-16808 が付与されている。

#### 【0078】

#### 【表 2】

manganese-sulfate 0.01 g/l, iron-sulfate 0.01 g/l, calcium-carbonate 30 g/l, ampicillin 50 mg/l, and L- threonine 0.5 g/l.

It cultured for 48 hours by 37 degrees-Celsius.

#### [0077]

The amount of L- methionine was measured by the amino acid analyzer (made in the Hitachi company) except the biomass from the culture.

This result was shown in Table 3.

L- methionine which did not observe in W3110strain, increased in W(Delta)BCstrain and W(Delta)BC(Delta)J strain.

As for the amount of L- methionine, the mutation of metK reduced in W(Delta)BC(Delta)JK-2strain.

However, in W(Delta)BC(Delta)JK-32 strain, it was equivalent. A raise observes in W(Delta)BC(Delta)JK-24strain.

The effect was observed in L- methionine production.

W(Delta) BC(Delta) JK-24 strain holding plasmid pMWPthrmA-W, the private number AJ13425 is provided.

From May 14th, Heisei 10, it was deposits to the Ministry of International Trade and Industry Agency of Industrial Science and Technology National Institute of Bioscience and Human-Technology (postal code 305-8566, 1-1-3 Higashi, Tsukuba Ibaraki-prefecture, Japan ). Acceptance-number FERM P-16808 is provided.

#### [0078]

#### [Table 2]

表 2 : 野生型metA導入株のL-メチオニン生産量

菌株	生成量 (g/l)
W3110/pMWPthrmetA-W (metA <sup>+</sup> )	0.000
WΔBC/pMWPthrmetA-W (thrBC <sup>-</sup> , metA <sup>+</sup> )	0.008
WΔBCΔJ/pMWPthrmetA-W (metBL <sup>+</sup> , thrBC <sup>-</sup> , metA <sup>+</sup> )	0.022
WΔBCΔJK-2/pMWPthrmetA-W (thrBC <sup>-</sup> , metJ <sup>-</sup> , metBL <sup>+</sup> , metK <sup>+</sup> , metA <sup>+</sup> )	0.014
WΔBCΔJK-24/pMWPthrmetA-W (thrBC <sup>-</sup> , metJ <sup>-</sup> , metBL <sup>+</sup> , metK <sup>+</sup> , metA <sup>+</sup> )	0.141
WΔBCΔJK-32/pMWPthrmetA-W (thrBC <sup>-</sup> , metJ <sup>-</sup> , metBL <sup>+</sup> , metK <sup>+</sup> , metA <sup>+</sup> )	0.023

metK<sup>+</sup> : 弱化型metK, metA<sup>+</sup> : metA増強, metBL<sup>+</sup> : metBL増強

L- methionine production amount of wild type metA introduced strain  
Strain, Production amount

【0079】

[0079]

## 【実施例 4】

metA 変異株及び阻害解除型  
metA 遺伝子の取得

W3110株を2mlのLB培地に植  
菌し、37℃で8時間培養した。  
この培養液1mlを5,000rpmで  
10分間遠心分離し、菌体を  
0.9%の食塩水で2度洗浄した。  
得られた菌体を100μlの0.  
9%食塩水に懸濁し、そのうち  
の5μlを5mlの1g/lのα-メチ  
ル-DL-メチオニン (MM) を含  
むデイビスーミンジオリ最少培  
地に植菌した。これを37℃で3  
日間培養した。この培養液を適  
当に希釈の後、1g/lのMMを含

## [Example 4]

Acquisition of metA mutant and an obstruction  
releasing type metA gene

3110 strain of W is inoculated to 2 ml LB  
medium.

It cultivated for 8 hours by 37 degrees-  
Celsius.

1 ml of 10 minutes of this culture solution is  
centrifuged by 5,000 rpm.

Microbial cells were twice washed by 0.9% of  
salt solution.

The obtained microbial cells are suspended to  
100-micro-l 0.9% salt solution.

Five of micro-l of it were inoculated to the day  
bis- Mingioli minimal medium containing  
(alpha)- methyl-DL-methionine (MM) of 5 ml 1  
g/l.

This was cultivated for 3 days by 37 degrees-

むデイビス—ミンジオリ最少培地に塗布し、37℃で一晩培養した。生育してきたコロニーの幾つかを LB 寒天培地上でコロニー分離し、再度 1 g/l の MM を含むデイビス—ミンジオリ最小培地での生育を確認した。この操作を 9 回独立に行い、6 個の独立した耐性株を得て、それぞれを WMM4、WMM5、WMM6、WMM7、WMM8、及び WMM9 と名付けた。

#### 【0080】

これらの耐性株から染色体 DNA を調製した。これを鋳型として配列番号 21 及び 22 に示す配列を有するプライマーを用いて PCR 反応を行い *metA* 遺伝子の増幅を行った。この増幅断片の塩基配列を配列番号 21 及び 22 に示した増幅用プライマー、並びに配列番号 23 及び 24 に示す配列を有するプライマーを用いて決定した。耐性株の *metA* 塩基配列は、配列番号 25 に示す野生型 *metA* の塩基配列上で、WMM4 株では 887 番目のチミンがグアニンに、WMM5 株では 893 番目のシトシンがチミンに、WMM6 株では野生型、WMM7 及び WMM8 株では 886 番目から 890 番目の塩基に相当する ATCTC なる配列が反復して存在しその間に約 1300 塩基からなる IS2 と呼ばれる挿入配列 (Ghosal, D. et al., Nucleic Acids Res. 6, 1111-1122 (1979)) が存在し、WMM9 株では 79 番目のシトシンがチミンに変化していた。この結果、

Celsius.

This culture solution is suitably applied to the day bis- Mingioli minimal medium containing MM of 1 g/l after a dilution.

A night culture was carried out by 37 degrees-Celsius.

The colony isolation of some of the grown colony is carried out on LB agar medium. Growth by the day bis- Mingioli minimum medium which contains MM of 1 g/l again was confirmed.

This operation is done independently 9 times. Six independent resistant strains are obtained. Each was named WMM4, WMM5, WMM6, WMM7, WMM8, and WMM9.

#### 【0080】

Chromosome DNA was prepared from these resistant strains.

PCR reaction was done using the primer which has the sequence shown in sequence number 21 and 22, using this as a template, and *metA* gene was amplified.

It determined using the primer for amplification which showed the base sequence of this amplification fragment to sequence number 21 and 22, and the primer which has the sequence which shows sequence number 23 and 24.

*metA* base sequence of a resistant strain, On the base sequence of wild-type *metA* shown in sequence number 25, In 4 strain of WMMs, the 887th thymine is guanine. In 5 strain of WMMs, the 893rd cytosine is thymine. In 6 strain of WMMs, it is a wild type. In WMM7 and WMM8 strains, the sequence of ATCTC corresponding to the base whose number is 890 from the 886th position exists repeatedly.

The insertion sequence (Ghosal, D.etal., NucleicAcidsRes.6, 1111-1122 (1979)) called IS2 which consists of about 1300 bases between them exists. In 9 strain of WMMs, the 79th cytosine was changing to thymine.

Consequently, in the amino acid sequence of HTS shown in sequence number 26, as for HTS of 4 strain of WMMs, the 296th isoleucine changes to serine. In WMM5strain, the 298th

配列番号 26 に示した HTS のアミノ酸配列において、WMM4 株の HTS は 296 番目のイソロイシンがセリンに、WMM5 株では 298 番目のプロリンがロイシンに、WMM7 及び WMM8 株では挿入配列によって 298 番目のプロリン以降がアルギニン-ロイシン-アラニン-プロリンからなる配列に、WMM9 株では 27 番目のアルギニンがシステインに変化していることが明らかとなった。

**【0081】**

metA 構造遺伝子に変異が認められた WMM4、WMM5、WMM9、及び WMM7 株を LB 培地にて 37°C で一晚試験管培養した培養液 1 ml を 5,000rpm で 10 分間遠心した後、1 ml の 0.9% の食塩水で 2 度洗浄した。これを 1 ml の 0.9% の食塩水に懸濁し、0.5ml を 50ml の最少培地に植菌し、37°C で一日培養した。培養液を 8,000rpm で 10 分間遠心した後、1 ml の 0.9% の食塩水で 2 度洗浄した。得られた菌体を 3 ml の 50mM リン酸カリウム (pH7.5)、1 mM ジチオスレイトールからなる緩衝液に懸濁し、実施例 1 に示したのと同じ操作を行い粗酵素抽出液を得た。粗酵素抽出液中の HTS 活性を、阻害剤の存在下で実施例 1 に記載の反応組成で測定した結果を、表 2 に示した。WMM7 株については活性を検出することが出来なかったが、これは挿入配列によるアミノ酸配列の変化により比活性が大きく低下したものと考えられた。

proline changes to a leucine. In WMM7 and WMM8 strain, the 298th proline or later changes to the sequence which consists of an arginine-leucine- alanine- proline with insertion sequences.

In WMM9 strain, it became evident that the 27th arginine is changing to cysteine.

**[0081]**

A night test tube culture of 7 WMMs of WMM4, WMM5, WMM9 and WMMs mutation was observed to be to metA structural gene was carried out by 37 degrees-Celsius by LB medium. After centrifuging 1 ml of 10 minutes of this culture solution by 5,000 rpm, it washed twice by 0.9% of 1 ml salt solution.

This is suspended to 0.9% of 1 ml salt solution. 0.5 ml is inoculated to a 50 ml minimal medium.

The one day incubation was carried out by 37 degrees-Celsius.

After centrifuging 10 minutes of culture solutions by 8,000 rpm, it washed twice by 0.9% of 1 ml salt solution.

The obtained biomass is suspended to the buffer which consists of 3 ml 50 mM potassium phosphate (pH7.5) and a 1 mM dithiothreitol.

The same operation as having been shown in Example 1 was done, and the crude-enzyme extract was obtained.

The result which measured HTS activity in a crude-enzyme extract by the reaction composition of Example 1 in the presence of the inhibitor was shown in Table 2.

About 7 strain of WMMs, the activity was undetectable. The specific activity reduced greatly by the change of the amino acid sequence by the insertion sequence.

The specific activities of the strain of other than that were about 1 of a wild strain, and

それ以外の株の比活性は野生株の約 1 / 4 程度であった。MM による阻害は WMM4、WMM5、及び WMM9 株のいずれにおいても解除されており、L-メチオニンによる阻害もかなり緩和していた。SAM による阻害は WMM9 株でほとんど解除が認められなかったが、WMM4 及び WMM5 株では解除する傾向が認められた。野生株 HTS 活性に最も強力な阻害を示した L-メチオニン及び SAM の組合せも WMM4 及び WMM5 株で顕著な緩和が認められた。

【 0 0 8 2 】

【表 3】

about 4.

The obstruction by MM is released also in any of WMM4, WMM5, and 9 strain of WMMs, and was also abating the obstruction by L-methionine considerably.

As for the obstruction by SAM, releasing hardly observed by 9 strain of WMMs.

However, the trend to release observed in WMM4 and 5 strain of WMMs.

The relaxation also with L- methionine which showed the strongest obstruction and the combination of SAM remarkable in a wild-strain HTS activity at WMM4 and WMM5 strain observed.

[0082]

[Table 3]



表 3 : 各種阻害剤存在下における耐性株由来の HTS の活性

阻 害 剤	HTS 活性 (mmol/min/mg蛋白質)				
	W3110	WMM9	WMM4	WMM5	WMM7
非添加	22.3	5.0	4.5	4.5	0.0
0.1mM MM	18.6	4.9	4.1	4.6	0.0
1mM MM	7.0	2.7	4.6	4.8	0.0
0.1mM Met	14.3	2.5	4.5	4.2	0.0
1mM Met	0.8	2.2	4.0	4.0	0.0
0.1mM SAM	17.0	1.1	4.6	3.6	0.0
1mM SAM	3.0	0.5	2.6	3.3	0.0
0.1mM SAM+0.1mM Met	0.0	0.9	5.6	2.8	0.0

HTS activity originated in MM resistant bacteria in the presence of each inhibitor  
 Inhibitor, HTS activity (protein),  
 Not added

【 0 0 8 3 】

[0083]

## 【実施例 5】

変異型 metA の導入による L-メ  
チオニン生産

実施例 4 で得られた metA の変  
異株のうち、WMM9 株、WMM4  
株、及び WMM5 株の染色体  
DNA を鋳型とし、配列番号 21  
及び配列番号 22 記載の配列を  
有するオリゴヌクレオチドをプ

## [Example 5]

L- methionine production by introduction of  
variant metA

a template chromosome DNA (WMM9strain,  
WMM4strain, and WMM5 strain) among the  
mutants of metA obtained in Example 4.

PCR reaction is respectively done, using the  
oligonucleotide which has the sequence of  
sequence number 21 and sequence number 22  
as a primer. The fragment containing metA

ライマーとしてそれぞれPCR反応を行い、metA 遺伝子を含む断片を増幅した。この増幅断片は、両端に SphI 及び Sall の認識配列が導入されている。この増幅断片の両端を SphI 及び Sall で切断し、SphI 及び Sall で切断した pHSG398 にクローニングした。挿入断片の塩基配列を決定し、変異点を確認した。このプラスミドの SphI 及び Sall による切断物、実施例1に記載のスレオニンプロモーターの HindIII 及び SphI による切断物、及び HindIII 及び Sall で切断した pMW118 (日本ジーン社製) を混合後、連結反応を行った。この反応液で JM109 株を形質転換し、形質転換体からプラスミドを抽出した。得られた組換えプラスミドから3者が連結されたプラスミドを選択した。これらをそれぞれ pMWPthrmetA-9、pMWPthrmetA-4、及び pMWPthrmetA-5 と名付けた。

**【0084】**

さらに各変異型 metA 遺伝子の変異点を組み合わせるため、部位特異的変異導入を Mutan-Super Express Km (宝酒造社製) を用いてその指示に従って行った。配列番号27記載の配列を有するオリゴヌクレオチドを用いて、metA-4 変異に metA-9 変異を組合わせて pMWPthrmetA-9+4 を作製した。同様に metA-5 変異に metA-9 変異を組合わせて pMWPthrmetA-9+5 を作製した。さらに配列番号28記載の配列を有するオリゴヌクレオ

gene was amplified.

As for this amplification fragment, the recognition sequence of SphI and Sall is introduced by both ends.

The both ends of this amplification fragment are cut by SphI and Sall.

It cloned to pHSG398 cut by SphI and Sall.

The base sequence of an insert is determined.

The mutating point was confirmed.

The ligation was done after mixing the cut article by SphI and Sall of this plasmid, the cut article by HindIII and SphI of the threonine promoter of Example 1, and pMW118 (made in a Japanese gene company) cut by HindIII and Sall.

JM109 strain is transformed by this reaction solution.

The plasmid was extracted from the transformed body.

The plasmid with which three persons were connected was selected from the obtained recombinant plasmid.

These were each named pMWPthrmetA-9, pMWPthrmetA-4, and pMWPthrmetA-5.

**[0084]**

Furthermore in order to combine the mutating point of each variant metA gene, site specific mutation introduction was done according to the indication using Mutan-SuperExpressKm (made in a Takara-Shuzo company).

metA-9 mutation is combined with metA-4 mutation using the oligonucleotide which has the sequence of sequence number 27. pMWPthrmetA-9+4 were produced.

metA-9 mutation was similarly combined with metA-5 mutation, and pMWPthrmetA-9+5 were produced.

Furthermore the oligonucleotide which has the sequence of sequence number 28 is used. metA-5 [ metA-4 and ] mutation is combined with metA-9 mutation. pMWPthrmetA-9+4+5

チドを用いて、metA-9 変異に metA-4 及び metA-5 変異を組合わせて pMWPthrmA-9+4+5 を作製した。

were produced.

#### 【0085】

これらのプラスミドを用いて W $\Delta$ BC $\Delta$ JK-32 株を形質転換し、形質転換体を得た。各形質転換体を、50mg/l のアンピシリンを含む LB プレート上、37°C で一晩培養した。菌体をグルコース 40g/l、硫酸マグネシウム 1 g/l、硫酸 16g/l、リン酸二水素カリウム 1 g/l、酵母抽出物 (Bacto Yeast-Extract (Difco) 2g/l、硫酸マンガン 0.01g/l、硫酸鉄 0.01g/l、炭酸カルシウム 30g/l、アンピシリン 50mg/l、L-スレオニン 0.5g/l を含む pH7 の培地 20ml に植菌し、37°C で 48 時間培養した。培養物から菌体を除き、アミノ酸分析計 (日立社製) にて L-メチオニン量を測定した。この結果を表 4 に示した。L-メチオニン蓄積量は、野生型 metA を導入した株に比べて、変異型の metA を導入した株では数倍増加した。さらに変異を組合わせることによって、L-メチオニン生産量のさらなる増加が認められた。

#### 【0085】

W(DELTA) BC(DELTA) JK-32 strain was transformed using these plasmids, and the transformed body was obtained.

Night incubation of each transformed body was carried out by 37 degrees-Celsius on LB plate containing a 50-mg/l ampicillin.

Biomass is inoculated in 20 ml of the mediums of pH7 containing Glucose 40 g/l, magnesium-sulfate 1 g/l, ammonium-sulfate 16 g/l, potassium-dihydrogenphosphate 1 g/l, a yeast extract (BactoYeast-Extract(Difco)2 g/l, manganese-sulfate 0.01 g/l, iron-sulfate 0.01 g/l, calcium-carbonate 30 g/l, ampicillin 50 mg/l, and L- threonine 0.5 g/l.

It cultured for 48 hours by 37 degrees-Celsius.

The amount of L- methionine was measured by the amino acid analyzer (made in the Hitachi company) except the biomass from the culture.

This result was shown in Table 4.

As for the amount of L- methionine accumulation, Compared with the strain which introduced wild-type metA, the increase in several times was carried out on the strain which introduced metA of a variant.

Furthermore by combining mutation, the further increase in L- methionine throughput observed.

#### 【0086】

#### 【0086】

#### 【表 4】

#### 【Table 4】

表 4 : 変異型metA導入株のL-メチオニン生産量

菌 株	L-メチオニン生成量 (g/l)
WΔBCΔJK-32/pMVPthrmetA-W	0. 0 2 3
WΔBCΔJK-32/pMVPthrmetA-9	0. 1 5 8
WΔBCΔJK-32/pMVPthrmetA-4	0. 1 0 8
WΔBCΔJK-32/pMVPthrmetA-5	0. 1 3 1
WΔBCΔJK-32/pMVPthrmetA-9+4	0. 2 0 6
WΔBCΔJK-32/pMVPthrmetA-5+9	0. 2 0 7
WΔBCΔJK-32/pMVPthrmetA-9+4+5	0. 2 3 6

L- methionine production amount of mutated metA introduced strain  
 Strain, L- methionine production amount

【0087】

[0087]

## 【発明の効果】

本発明により、L-メチオニン生産能を有する微生物が提供される。同微生物は、L-メチオニン生産菌として、また、L-メチオニン生産菌の育種の材料として利用することができる。本発明の変異型 metA 遺伝子は、L-メチオニン及びSAMによる協奏阻害が解除されているので、L-メチオニン生産菌の育種に利用することができる。

## [EFFECT OF THE INVENTION]

The microorganisms which have L- methionine producing ability are provided by this invention.

The said microorganisms can be utilized as material of the breeding of L- methionine producing microbe as a L- methionine producing microbe.

As for the variant metA gene of this invention, the concerned\_inhibition by L- methionine and SAM is released.

Therefore it can utilize for the breeding of L- methionine producing microbe.

【 0 0 8 8 】

[0088]

## 【配列表】

## SEQUENCE LISTING

<110> 味の素株式会社  
(Ajinomoto Co., Ltd)<120> 発酵法による L-メチ  
オニンの製造法 (Method for  
Producing L-Methion  
ine by Fermentation)

&lt;130&gt; P-6041

&lt;141&gt; 1998-11-17

&lt;160&gt; 29

&lt;170&gt; PatentIn Ver. 2.0

## [Sequence table]

## SEQUENCE LISTING

<110> Ajinomoto Co., Inc. K.K. (Ajinomoto Co.,  
Ltd)<120> The manufacturing method of L-  
methionine by the fermentation method  
(Method for Producing L-  
Methionine by Fermentation)

&lt;130&gt; P-6041

&lt;141&gt; 1998-11-17

&lt;160&gt; 29

&lt;170&gt; PatentIn Ver.2.0

【 0 0 8 9 】

[0089]

&lt;210&gt; 1

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 28

&lt;211&gt; 28

&lt;212&gt; DNA

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;220&gt;

<223> Description of Artificial  
Sequence: primer

&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence: primer

&lt;400&gt; 1

&lt;400&gt; 1

gggaattctg

gggaattctggcaggaggaactggcgca

ctggcgca

gcaggaggaa

28

28

【 0 0 9 0 】

[0090]

&lt;210&gt; 2

&lt;210&gt; 2

&lt;211&gt; 28

&lt;211&gt; 28

&lt;212&gt; DNA

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;220&gt;

<223> Description of Artificial  
Sequence: primer

&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence: primer

&lt;400&gt; 2

&lt;400&gt; 2

gggtcgacgc

gggtcgacgctcatattggcactggaag

actggaag

tcatattggc

28

28

【 0 0 9 1 】

[0091]

&lt;210&gt; 3

&lt;210&gt; 3

&lt;211&gt; 28

&lt;211&gt; 28

&lt;212&gt; DNA

&lt;212&gt; DNA

<213> Artificial Sequence	<213>ArtificialSequence
<220>	<220>
<223> Description of Artificial Sequence:primer	<223>DescriptionofArtificialSequence:primer
<400> 3	<400>3
gggtcgacat cagtaaaatc tattcatt	gggtcgacatcagtaaaatctattcatt
28	28

<b>[ 0 0 9 2 ]</b>	<b>[0092]</b>
<210> 4	<210>4
<211> 28	<211>28
<212> DNA	<212>DNA
<213> Artificial Sequence	<213>ArtificialSequence
<220>	<220>
<223> Description of Artificial Sequence:primer	<223>DescriptionofArtificialSequence:primer
<400> 4	<400>4
ggaagcttgc ccgagggaaa	ggaagcttgcccgagggaaagatctgta
gatctgta	28
28	

<b>[ 0 0 9 3 ]</b>	<b>[0093]</b>
<210> 5	<210>5
<211> 28	<211>28
<212> DNA	<212>DNA
<213> Artificial Sequence	<213>ArtificialSequence
<220>	<220>
<223> Description of Artificial Sequence:primer	<223>DescriptionofArtificialSequence:primer
<400> 5	<400>5
gggcatgccc agggaacttc	gggcatgcccagggaaacttcacacatg
atcacatg	28
28	

<b>[ 0 0 9 4 ]</b>	<b>[0094]</b>
<210> 6	<210>6
<211> 28	<211>28
<212> DNA	<212>DNA
<213> Artificial Sequence	<213>ArtificialSequence
<220>	<220>
<223> Description of Artificial Sequence:primer	<223>DescriptionofArtificialSequence:primer
<400> 6	<400>6
gggaattctc atggttcgcg cgtagag	gggaattctcatggttcgcgcgtagag
28	28

<b>[ 0 0 9 5 ]</b>	<b>[0095]</b>
--------------------	---------------

<210> 7	<210>7
<211> 28	<211>28
<212> DNA	<212>DNA
<213> Artificial Sequence	<213>ArtificialSequence
<220>	<220>
<223> Description of Artificial Sequence:primer	<223>DescriptionofArtificialSequence:primer
<400> 7	<400>7
ggaagcttgc	ggaagcttgcgtgagatggggattaacc
gattaacc	gtgagatggg
28	28

<b>[ 0 0 9 6 ]</b>	<b>[0096]</b>
<210> 8	<210>8
<211> 28	<211>28
<212> DNA	<212>DNA
<213> Artificial Sequence	<213>ArtificialSequence
<220>	<220>
<223> Description of Artificial Sequence:primer	<223>DescriptionofArtificialSequence:primer
<400> 8	<400>8
gggaattcta ctgtagctg ctcttgcg	gggaattctactgctagctgctcttgcg
28	28

<b>[ 0 0 9 7 ]</b>	<b>[0097]</b>
<210> 9	<210>9
<211> 75	<211>75
<212> DNA	<212>DNA
<213> Artificial Sequence	<213>ArtificialSequence
<220>	<220>
<223> Description of Artificial Sequence:primer.	<223>DescriptionofArtificialSequence:primer
<400> 9	<400>9
ggaagcttaa aattttattg acttaggtca	ggaagcttaaaattttattgacttaggtcactaaatactttaacca
ctaaatactt taaccaatat	atataggcatagcg60cacagacgcatgccc
aggcatagcg 60	75
cacagacgca	tgccc
75	

<b>[ 0 0 9 8 ]</b>	<b>[0098]</b>
<210> 10	<210>10
<211> 75	<211>75
<212> DNA	<212>DNA
<213> Artificial Sequence	<213>ArtificialSequence
<220>	<220>
<223> Description of Artificial Sequence:primer	<223>DescriptionofArtificialSequence:primer
	<400>10

<400> 10	gggcatg	cgctctgtgcgcta	tcctatatt	gggttaa	agtagt	tttagt
gggcatg	cgctctgtgcgcta	tcctatatt	gggttaa	agtagt	tttagt	
gggttaa	agtagt	tttagt	gacc	75		
taagtcaata	60					
aaattttaag		cttcc				
75						

<b>[ 0 0 9 9 ]</b>	<b>[0099]</b>
<210> 11	<210>11
<211> 18	<211>18
<212> DNA	<212>DNA
<213> Artificial Sequence	<213>ArtificialSequence
<220>	<220>
<223> Description of Artificial Sequence:primer	<223>DescriptionofArtificialSequence:primer
<400> 11	<400>11
caacagtttg	caacagtttgagctaacc
18	18
agctaacc	

<b>[ 0 1 0 0 ]</b>	<b>[0100]</b>
<210> 12	<210>12
<211> 20	<211>20
<212> DNA	<212>DNA
<213> Artificial Sequence	<213>ArtificialSequence
<220>	<220>
<223> Description of Artificial Sequence:primer	<223>DescriptionofArtificialSequence:primer
<400> 12	<400>12
gcgggttttt	gcgggtttttgcccggatgc
20	20
tgcccggatgc	

<b>[ 0 1 0 1 ]</b>	<b>[0101]</b>
<210> 13	<210>13
<211> 18	<211>18
<212> DNA	<212>DNA
<213> Artificial Sequence	<213>ArtificialSequence
<220>	<220>
<223> Description of Artificial Sequence:primer	<223>DescriptionofArtificialSequence:primer
<400> 13	<400>13
tcggctacgc	tcggctacgcaactaatg
18	18
aactaatg	

<b>[ 0 1 0 2 ]</b>	<b>[0102]</b>
<210> 14	<210>14
<211> 18	<211>18
<212> DNA	<212>DNA



<213> Artificial Sequence	<213>ArtificialSequence
<220>	<220>
<223> Description of Artificial Sequence:primer	<223>DescriptionofArtificialSequence:primer
<400> 14	<400>14
gagaatgcac	gagaatgcaccgccaccg
cgccaccg	18
18	
<b>[ 0 1 0 3 ]</b>	<b>[0103]</b>
<210> 15	<210>15
<211> 18	<211>18
<212> DNA	<212>DNA
<213> Artificial Sequence	<213>ArtificialSequence
<220>	<220>
<223> Description of Artificial Sequence:primer	<223>DescriptionofArtificialSequence:primer
<400> 15	<400>15
tggcgcgtca	tggcgcgtcacggtggcg
cggtggcg	18
18	
<b>[ 0 1 0 4 ]</b>	<b>[0104]</b>
<210> 16	<210>16
<211> 18	<211>18
<212> DNA	<212>DNA
<213> Artificial Sequence	<213>ArtificialSequence
<220>	<220>
<223> Description of Artificial Sequence:primer	<223>DescriptionofArtificialSequence:primer
<400> 16	<400>16
gcacgtcgg	gcacgtcggtttcattag
ttcattag	18
18	
<b>[ 0 1 0 5 ]</b>	<b>[0105]</b>
<210> 17	<210>17
<211> 1155	<211>1155
<212> DNA	<212>DNA
<213> Escherichia coli	<213>Escherichiacoli
<220>	<220>
<221> CDS	<221>CDS
<222> (1)..(1152)	<222>(1)..(1152)
<400> 17	<400>17
atg gca aaa cac ctt ttt acg tcc	atggcaaaacaccttttacgtccgagtcggtctctgaagggcat
gag tcc gtc tct gaa ggg cat cct	cct 48
48	MetAlaLysHisLeuPheThrSerGluSerValSerGluG
Met Ala Lys His Leu Phe Thr	lyHisPro
Ser Glu Ser Val Ser Glu Gly His	1 5 10
Pro	15

1	5	gacaaaattgctgaccaaatttctgatgccgttttagacgcgatc
10	15	ctc 96
gac aaa att gct gac caa att tct	AspLysIleAlaAspGlnIleSerAspAlaValLeuAspAla	
gat gcc gtt tta gac gcg atc ctc	IleLeu	
96	20	25
Asp Lys Ile Ala Asp Gln Ile Ser	30	
Asp Ala Val Leu Asp Ala Ile Leu	gaacaggatccgaaagcacgcgttgcttgcgaaacctacgta	
20	aaaacc 144	
25	30	GluGlnAspProLysAlaArgValAlaCysGluThrTyrVa
gaa cag gat ccg aaa gca cgc gtt	ILysThr	
gct tgc gaa acc tac gta aaa acc	35	40
144	45	
Glu Gln Asp Pro Lys Ala Arg Val	ggcatggttttagttggcggcgaaatcaccaccagcgctgggt	
Ala Cys Glu Thr Tyr Val Lys Thr	agac 192	
35	GlyMetValLeuValGlyGlyGlulleThrThrSerAlaTrp	
40	45	ValAsp
ggc atg gtt tta gtt ggc ggc gaa	50	55
atc acc acc agc gcc tgg gta gac	60	
192	atcgaagagatcacccgtaacaccgttcgcgaaattggctatgt	
Gly Met Val Leu Val Gly Gly Glu	gcat 240	
Ile Thr Thr Ser Ala Trp Val Asp	IleGluGlulleThrArgAsnThrValArgGlulleGlyTyrVa	
50	IHis	
60	65	70
atc gaa gag atc acc cgt aac acc	75	80
gtt cgc gaa att ggc tat gtg cat	tccgacatgggctttgacgctaactcctgtgcggttctgagcgct	
240	atc 288	
Ile Glu Glu Ile Thr Arg Asn Thr	SerAspMetGlyPheAspAlaAsnSerCysAlaValLeu	
Val Arg Glu Ile Gly Tyr Val His	SerAlalle	
65	85	90
75	95	
tcc gac atg ggc ttt gac gct aac	ggcaaacagtctcctgacatcaaccagggcggtgaccgtgcc	
tcc tgt gcg gtt ctg agc gct atc	gatccg 336	
288	GlyLysGlnSerProAspIleAsnGlnGlyValAspArgAl	
Ser Asp Met Gly Phe Asp Ala	aAspPro	
Asn Ser Cys Ala Val Leu Ser	100	105
Ala Ile	110	
85	ctggaacagggcgcggtgaccagggctctgatgtttggctacg	
90	caact 384	
ggc aaa cag tct cct gac atc aac	LeuGluGlnGlyAlaGlyAspGlnGlyLeuMetPheGly	
cag ggc gtt gac cgt gcc gat ccg	TyrAlaThr	
336	115	120
Gly Lys Gln Ser Pro Asp Ile Asn	125	
Gln Gly Val Asp Arg Ala Asp	aatgaaaccgacgtgctgatgccagcacctatcacctatgcac	
Pro	accgt 432	
100	AsnGluThrAspValLeuMetProAlaProIleThrTyrAl	
105	aHisArg	
ctg gaa cag ggc gcg ggt gac	130	135

cag ggt ctg atg ttt ggc tac gca	140	ctggtacagcgctcaggctgaagtgcgtaaaaaacggcactctgc	
act 384		cgtagg 480	
Leu Glu Gln Gly Ala Gly Asp		LeuValGlnArgGlnAlaGluValArgLysAsnGlyThrLe	
Gln Gly Leu Met Phe Gly Tyr		uProTrp	
Ala Thr			
115		145	150
120	125	155	160
aat gaa acc gac gtg ctg atg cca		ctgcgcccgacgcgaaaagccagggtgactttcagtatgacg	
gca cct atc acc tat gca cac cgt		acggc 528	
432		LeuArgProAspAlaLysSerGlnValThrPheGlnTyrA	
Asn Glu Thr Asp Val Leu Met		spAspGly	
Pro Ala Pro Ile Thr Tyr Ala His		165	170
Arg		175	
130	135	aaaaatcggttatcgatgctgtcgtgctttccactcagcactctg	
140		aa 576	
ctg gta cag cgt cag gct gaa gtg		LysIleValGlyIleAspAlaValValLeuSerThrGlnHisS	
cgt aaa aac ggc act ctg ccg tgg		erGlu	
480		180	185
Leu Val Gln Arg Gln Ala Glu Val		190	
Arg Lys Asn Gly Thr Leu Pro		gagatcgaccagaaatcgctgcaagaagcggtaaatggaaga	
Trp		gatcatc 624	
145	150	GlulleAspGlnLysSerLeuGlnGluAlaValMetGluGl	
155	160	ullelle	
ctg cgc ccg gac gcg aaa agc		195	200
cag gtg act ttt cag tat gac gac		205	
ggc 528		aagccaattctgcccgctgaatggctgactctgccaccaaattc	
Leu Arg Pro Asp Ala Lys Ser		ttc 672	
Gln Val Thr Phe Gln Tyr Asp		LysProlleLeuProAlaGluTrpLeuThrSerAlaThrLys	
Asp Gly		PhePhe	
165		210	215
170	175	220	
aaa atc gtt ggt atc gat gct gtc		atcaaccggacccggtcggttcgttatcggtggcccaatgggtga	
gtg ctt tcc act cag cac tct gaa		ctgc 720	
576		IleAsnProThrGlyArgPheValIleGlyGlyProMetGly	
Lys Ile Val Gly Ile Asp Ala Val		AspCys	
Val Leu Ser Thr Gln His Ser Glu		225	230
180		235	
185	190	240	
gag atc gac cag aaa tcg ctg caa		ggtctgactggtcgtaaaattatcggtgatacctacggcggcatg	
gaa gcg gta atg gaa gag atc atc		gcg 768	
624		GlyLeuThrGlyArgLysIlelleValAspThrTyrGlyGly	
Glu Ile Asp Gln Lys Ser Leu Gln		MetAla	
Glu Ala Val Met Glu Glu Ile Ile		245	250
195		255	
200	205	cgtcacggtggcggtgcattctctggttaaagatccatcaaaagt	
aag cca att ctg ccc gct gaa tgg		ggac 816	
ctg act tct gcc acc aaa ttc ttc		ArgHisGlyGlyGlyAlaPheSerGlyLysAspProSerL	
		ysValAsp	

672		260	265
Lys Pro Ile Leu Pro Ala Glu Trp		270	
Leu Thr Ser Ala Thr Lys Phe		cggtccgcagcctacgcagcacgttatgtcgcgaaaaacatcg	
Phe		ttgct 864	
210	215	ArgSerAlaAlaTyrAlaAlaArgTyrValAlaLysAsnIleV	
220		alAla	
atc aac ccg acc ggt cgt ttc gtt		275	280
atc ggt ggc cca atg ggt gac tgc		285	
720		gctggcctggccgatcgttgtgaaattcaggttctacgcaatc	
Ile Asn Pro Thr Gly Arg Phe Val		ggc 912	
Ile Gly Gly Pro Met Gly Asp Cys		AlaGlyLeuAlaAspArgCysGluIleGlnValSerTyrAla	
225	230	IleGly	
235	240	290	295
ggt ctg act ggt cgt aaa att atc gtt		300	
gat acc tac ggc ggc atg gcg		gtggctgaaccgacctccatcatggttagaaactttcggtactga	
768		gaaa 960	
Gly Leu Thr Gly Arg Lys Ile Ile		ValAlaGluProThrSerIleMetValGluThrPheGlyThr	
Val Asp Thr Tyr Gly Gly Met Ala		GluLys	
	245	305	310
250	255	315	320
cgt cac ggt ggc ggt gca ttc tct		gtgccttctgaacaactgaccctgctggtacgtgagttctcgac	
ggt aaa gat cca tca aaa gtg gac		ctg 1008	
816		ValProSerGluGlnLeuThrLeuLeuValArgGluPheP	
Arg His Gly Gly Gly Ala Phe Ser		heAspLeu	
Gly Lys Asp Pro Ser Lys Val		325	330
Asp		335	
	260	cgcccatacggtctgattcagatgctggatctgctgcacccgatc	
265	270	tac 1056	
cgt tcc gca gcc tac gca gca cgt		ArgProTyrGlyLeuIleGlnMetLeuAspLeuLeuHisPr	
tat gtc gcg aaa aac atc gtt gct		olleTyr	
864		340	345
Arg Ser Ala Ala Tyr Ala Ala Arg		350	
Tyr Val Ala Lys Asn Ile Val Ala		aaagaaaccgcagcatacggctcactttggtcgtgaacatttccc	
	275	gtgg 1104	
280	285	LysGluThrAlaAlaTyrGlyHisPheGlyArgGluHisPh	
gct ggc ctg gcc gat cgt tgt gaa		eProTrp	
att cag gtt tcc tac gca atc ggc		355	360
912		365	
Ala Gly Leu Ala Asp Arg Cys		gaaaaaaccgacaaagcgcagctgctgcgcgatgctgccgg	
Glu Ile Gln Val Ser Tyr Ala Ile		tctgaag 1152	
Gly		GluLysThrAspLysAlaGlnLeuLeuArgAspAlaAlaG	
	290	lyLeuLys	
300	295	370	375
gtg gct gaa ccg acc tcc atc atg		380	
gta gaa act ttc ggt act gag aaa		taa	
960		1155	
Val Ala Glu Pro Thr Ser Ile Met			

Val Glu Thr Phe Gly Thr Glu Lys  
 305 310

315 320  
 gtg cct tct gaa caa ctg acc ctg  
 ctg gta cgt gag ttc ttc gac ctg  
 1008

Val Pro Ser Glu Gln Leu Thr  
 Leu Leu Val Arg Glu Phe Phe  
 Asp Leu

325

330 335  
 cgc cca tac ggt ctg att cag atg  
 ctg gat ctg ctg cac ccg atc tac  
 1056

Arg Pro Tyr Gly Leu Ile Gln Met  
 Leu Asp Leu Leu His Pro Ile Tyr

340

345 350  
 aaa gaa acc gca gca tac ggt  
 cac ttt ggt cgt gaa cat ttc ccg  
 tgg 1104

Lys Glu Thr Ala Ala Tyr Gly His  
 Phe Gly Arg Glu His Phe Pro  
 Trp

355

360 365  
 gaa aaa acc gac aaa gcg cag  
 ctg ctg cgc gat gct gcc ggt ctg  
 aag 1152

Glu Lys Thr Asp Lys Ala Gln  
 Leu Leu Arg Asp Ala Ala Gly  
 Leu Lys

370

375

380

taa

1155

[ 0 1 0 6 ]

&lt;210&gt; 18

&lt;211&gt; 384

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Escherichia coli

&lt;400&gt; 18

Met Ala Lys His Leu Phe Thr  
 Ser Glu Ser Val Ser Glu Gly His  
 Pro

1

5 15

[0106]

&lt;210&gt;18

&lt;211&gt;384

&lt;212&gt;PRT

&lt;213&gt;Escherichiacoli

&lt;400&gt;18

MetAlaLysHisLeuPheThrSerGluSerValSerGluG  
 lyHisPro

1

5

10

10	15	AspLysIleAlaAspGlnIleSerAspAlaValLeuAspAla	
Asp Lys Ile Ala Asp Gln Ile Ser		IleLeu	
Asp Ala Val Leu Asp Ala Ile Leu	20		25
	20	30	
25	30	GluGlnAspProLysAlaArgValAlaCysGluThrTyrVa	
Glu Gln Asp Pro Lys Ala Arg Val		ILysThr	
Ala Cys Glu Thr Tyr Val Lys Thr	35		40
	35	45	
40	45	GlyMetValLeuValGlyGlyGluIleThrThrSerAlaTrp	
Gly Met Val Leu Val Gly Gly Glu		ValAsp	
Ile Thr Thr Ser Ala Trp Val Asp	50		55
	50	60	
60		IleGluGluIleThrArgAsnThrValArgGluIleGlyTyrVa	
Ile Glu Glu Ile Thr Arg Asn Thr		IHis	
Val Arg Glu Ile Gly Tyr Val His	65		70
	65	75	
75	80	SerAspMetGlyPheAspAlaAsnSerCysAlaValLeu	
Ser Asp Met Gly Phe Asp Ala		SerAlaIle	
Asn Ser Cys Ala Val Leu Ser	85		90
Ala Ile		95	
	85	GlyLysGlnSerProAspIleAsnGlnGlyValAspArgAl	
90	95	aAspPro	
Gly Lys Gln Ser Pro Asp Ile Asn		100	105
Gln Gly Val Asp Arg Ala Asp		110	
Pro		LeuGluGlnGlyAlaGlyAspGlnGlyLeuMetPheGly	
	100	TyrAlaThr	
105	110	115	120
Leu Glu Gln Gly Ala Gly Asp		125	
Gln Gly Leu Met Phe Gly Tyr		AsnGluThrAspValLeuMetProAlaProlleThrTyrAl	
Ala Thr		aHisArg	
	115	130	135
120	125	140	
Asn Glu Thr Asp Val Leu Met		LeuValGlnArgGlnAlaGluValArgLysAsnGlyThrLe	
Pro Ala Pro Ile Thr Tyr Ala His		uProTrp	
Arg		145	150
	130	155	
140	135	160	
Leu Val Gln Arg Gln Ala Glu Val		LeuArgProAspAlaLysSerGlnValThrPheGlnTyrA	
Arg Lys Asn Gly Thr Leu Pro		spAspGly	
Trp		165	170
145	150	175	
155	160	LysIleValGlyIleAspAlaValValLeuSerThrGlnHisS	
Leu Arg Pro Asp Ala Lys Ser		erGlu	
Gln Val Thr Phe Gln Tyr Asp		180	185
Asp Gly		190	
	165	GluIleAspGlnLysSerLeuGlnGluAlaValMetGluGl	
170	175	ullelle	200
		195	

Lys Ile Val Gly Ile Asp Ala Val	205	
Val Leu Ser Thr Gln His Ser Glu	LysProlleLeuProAlaGluTrpLeuThrSerAlaThrLys	
180	PhePhe	
185	210	215
Glu Ile Asp Gln Lys Ser Leu Gln	220	
Glu Ala Val Met Glu Glu Ile Ile	IleAsnProThrGlyArgPheValIleGlyGlyProMetGly	
195	AspCys	
200	225	230
Lys Pro Ile Leu Pro Ala Glu Trp	235	240
Leu Thr Ser Ala Thr Lys Phe	GlyLeuThrGlyArgLysIleIleValAspThrTyrGlyGly	
Phe	MetAla	
210	245	250
220	255	
Ile Asn Pro Thr Gly Arg Phe Val	ArgHisGlyGlyGlyAlaPheSerGlyLysAspProSerL	
Ile Gly Gly Pro Met Gly Asp Cys	ysValAsp	
225	260	265
235	270	
Gly Leu Thr Gly Arg Lys Ile Ile	ArgSerAlaAlaTyrAlaAlaArgTyrValAlaLysAsnIleV	
Val Asp Thr Tyr Gly Gly Met Ala	alAla	
245	275	280
250	285	
Arg His Gly Gly Gly Ala Phe Ser	AlaGlyLeuAlaAspArgCysGluIleGlnValSerTyrAla	
Gly Lys Asp Pro Ser Lys Val	IleGly	
Asp	290	295
260	300	
265	ValAlaGluProThrSerIleMetValGluThrPheGlyThr	
Arg Ser Ala Ala Tyr Ala Ala Arg	GluLys	
Tyr Val Ala Lys Asn Ile Val Ala	305	310
275	315	
280	320	
Ala Gly Leu Ala Asp Arg Cys	ValProSerGluGlnLeuThrLeuLeuValArgGluPheP	
Glu Ile Gln Val Ser Tyr Ala Ile	heAspLeu	
Gly	325	330
290	335	
300	ArgProTyrGlyLeuIleGlnMetLeuAspLeuLeuHisPr	
Val Ala Glu Pro Thr Ser Ile Met	olleTyr	
Val Glu Thr Phe Gly Thr Glu Lys	340	345
305	350	
315	LysGluThrAlaAlaTyrGlyHisPheGlyArgGluHisPh	
Val Pro Ser Glu Gln Leu Thr	eProTrp	
Leu Leu Val Arg Glu Phe Phe	355	360
Asp Leu	365	
325	GluLysThrAspLysAlaGlnLeuLeuArgAspAlaAlaG	
330	lyLeuLys	
335	370	375
Arg Pro Tyr Gly Leu Ile Gln Met	380	
Leu Asp Leu Leu His Pro Ile Tyr		
340		

345                      350  
 Lys Glu Thr Ala Ala Tyr Gly His  
 Phe Gly Arg Glu His Phe Pro  
 Trp

355  
 360                      365  
 Glu Lys Thr Asp Lys Ala Gln  
 Leu Leu Arg Asp Ala Ala Gly  
 Leu Lys

370                      375  
 380

<b>[ 0 1 0 7 ]</b>	<b>[0107]</b>
<210> 19	<210>19
<211> 28	<211>28
<212> DNA	<212>DNA
<213> Artificial Sequence	<213>ArtificialSequence
<220>	<220>
<223> Description of Artificial Sequence:primer	<223>DescriptionofArtificialSequence:primer
<400> 19	<400>19
ggaagcttaa	ggaagcttaagcagagatgcagagtgcg
agagtgcg	gcagagatgc
28	28

<b>[ 0 1 0 8 ]</b>	<b>[0108]</b>
<210> 20	<210>20
<211> 28	<211>28
<212> DNA	<212>DNA
<213> Artificial Sequence	<213>ArtificialSequence
<220>	<220>
<223> Description of Artificial Sequence:primer	<223>DescriptionofArtificialSequence:primer
<400> 20	<400>20
ggaagcttgg	ggaagcttggtgcggtataagaggccac
gaggccac	tgcggtataa
28	28

<b>[ 0 1 0 9 ]</b>	<b>[0109]</b>
<210> 21	<210>21
<211> 28	<211>28
<212> DNA	<212>DNA
<213> Artificial Sequence	<213>ArtificialSequence
<220>	<220>
<223> Description of Artificial Sequence:primer	<223>DescriptionofArtificialSequence:primer
<400> 21	<400>21
	gggcatgctgtagtgaggtaatcaggtt



gggcatgctg tagtgaggta atcaggt 28  
 28

<b>[0110]</b>	<b>[0110]</b>
<210> 22	<210>22
<211> 28	<211>28
<212> DNA	<212>DNA
<213> Artificial Sequence	<213>ArtificialSequence
<220>	<220>
<223> Description of Artificial Sequence:primer	<223>DescriptionofArtificialSequence:primer
<400> 22	<400>22
gggtcgactt aatccagcgt tggattca 28	gggtcgacttaatccagcgttggattca
28	

<b>[0111]</b>	<b>[0111]</b>
<210> 23	<210>23
<211> 18	<211>18
<212> DNA	<212>DNA
<213> Artificial Sequence	<213>ArtificialSequence
<220>	<220>
<223> Description of Artificial Sequence:primer	<223>DescriptionofArtificialSequence:primer
<400> 23	<400>23
tgtctgctgg gcggtaca 18	tgtctgctgggcggtaca
18	

<b>[0112]</b>	<b>[0112]</b>
<210> 24	<210>24
<211> 18	<211>18
<212> DNA	<212>DNA
<213> Artificial Sequence	<213>ArtificialSequence
<220>	<220>
<223> Description of Artificial Sequence:primer	<223>DescriptionofArtificialSequence:primer
<400> 24	<400>24
agagagtttt tcggtgcg 18	agagagtttttcggtgcg
18	

<b>[0113]</b>	<b>[0113]</b>
<210> 25	<210>25
<211> 930	<211>930
<212> DNA	<212>DNA
<213> Escherichia coli	<213>Escherichiacoli
<220>	<220>
<221> CDS	<221>CDS
<222> (1)..(927)	<222>(1)..(927)

<400> 25	<400>25
atg ccg att cgt gtg ccg gac gag	atgccgattcgtgtgccggacgagctacccgccgtcaatttctg
cta ccc gcc gtc aat ttc ttg cgt	cgt 48
48	MetProlleArgValProAspGluLeuProAlaValAsnPh
Met Pro Ile Arg Val Pro Asp Glu	eLeuArg
Leu Pro Ala Val Asn Phe Leu	1 5 10
Arg	15
1	5 gaagaaaacgtctttgtgatgacaacttctcgtgcgtctggtcag
10	gaa 96
15	GluGluAsnValPheValMetThrThrSerArgAlaSerGl
gaa gaa aac gtc ttt gtg atg aca	yGlnGlu
act tct cgt gcg tct ggt cag gaa	20 25
96	30
Glu Glu Asn Val Phe Val Met	attcgtccacttaaggttctgatccttaacctgatgccgaagaag
Thr Thr Ser Arg Ala Ser Gly Gln	att 144
Glu	IleArgProLeuLysValLeulleLeuAsnLeuMetProLy
20	sLyslle
25	35 40
30	45
att cgt cca ctt aag gtt ctg atc ctt	gaaactgaaaatcagtttctgcgcctgctttcaaactcacctttgc
aac ctg atg ccg aag aag att	ag 192
144	GluThrGluAsnGlnPheLeuArgLeuLeuSerAsnSer
Ile Arg Pro Leu Lys Val Leu Ile	ProLeuGln
Leu Asn Leu Met Pro Lys Lys	50 55
Ile	60
35	45
40	gtc gat attcagctgttgccgatcgattcccgatgaatcgcgcaac
45	acg 240
gaa act gaa aat cag ttt ctg cgc	ValAspIleGlnLeuLeuArgIleAspSerArgGluSerAr
ctg ctt tca aac tca cct ttg cag	gAsnThr
192	65 70
Glu Thr Glu Asn Gln Phe Leu	75 80
Arg Leu Leu Ser Asn Ser Pro	cccgcagagcatctgaacaacttctactgtaactttgaagatatt
Leu Gln	cag 288
50	ProAlaGluHisLeuAsnAsnPheTyrCysAsnPheGlu
55	AspIleGln
60	85 90
gtc gat att cag ctg ttg cgc atc	95
gat tcc cgt gaa tcg cgc aac acg	gatcagaactttgacggtttgattgtaactgggtgcgccgctgggc
240	ctg 336
Val Asp Ile Gln Leu Leu Arg Ile	AspGlnAsnPheAspGlyLeulleValThrGlyAlaProL
Asp Ser Arg Glu Ser Arg Asn	euGlyLeu
Thr	100 105
65	70
75	80
ccc gca gag cat ctg aac aac ttc	110
tac tgt aac ttt gaa gat att cag	gtggagttaatgatgtcgcttactggccgcagatcaaacaggt
288	gctg 384
Pro Ala Glu His Leu Asn Asn	ValGluPheAsnAspValAlaTyrTrpProGlnlleLysGln
Phe Tyr Cys Asn Phe Glu Asp	ValLeu
Ile Gln	

90	85	115	120
gat cag aac ttt gac ggt ttg att	95	125	
gta act ggt gcg ccg ctg ggc ctg		gcg 432	
336		GluTrpSerLysAspHisValThrSerThrLeuPheValC	
Asp Gln Asn Phe Asp Gly Leu		ysTrpAla	
Ile Val Thr Gly Ala Pro Leu Gly		130	135
Leu		140	
	100	gtacaggccgcgctcaatatcctctacggcattcctaagcaaac	
105	110	tcgc 480	
gtg gag ttt aat gat gtc gct tac		ValGlnAlaAlaLeuAsnIleLeuTyrGlyIleProLysGlnT	
tgg ccg cag atc aaa cag gtg ctg		hrArg	
384		145	150
Val Glu Phe Asn Asp Val Ala		155	160
Tyr Trp Pro Gln Ile Lys Gln Val		accgaaaaactctctggcggttacgagcatcatattccatctc	
Leu		at 528	
	115	ThrGluLysLeuSerGlyValTyrGluHisHisIleLeuHis	
120	125	ProHis	
gag tgg tcg aaa gat cac gtc acc		165	170
tcg acg ctg ttt gtc tgc tgg gcg		175	
432		gcgctctgacgcgtggccttgatgattcattcctggcaccgcatt	
Glu Trp Ser Lys Asp His Val Thr		cg 576	
Ser Thr Leu Phe Val Cys Trp		AlaLeuLeuThrArgGlyPheAspAspSerPheLeuAla	
Ala		ProHisSer	
	130	180	185
140	135	190	
gta cag gcc gcg ctc aat atc ctc		cgctatgctgactttccggcagcggtgattcgtgattacaccgatc	
tac ggc att cct aag caa act cgc		tg 624	
480		ArgTyrAlaAspPheProAlaAlaLeuIleArgAspTyrTh	
Val Gln Ala Ala Leu Asn Ile Leu		rAspLeu	
Tyr Gly Ile Pro Lys Gln Thr Arg		195	200
145	150	205	
155	160	gaaattctggcagagacggaagaaggggatgcatactctgtttg	
acc gaa aaa ctc tct ggc gtt tac		ccagt 672	
gag cat cat att ctc cat cct cat		GlulleLeuAlaGluThrGluGluGlyAspAlaTyrLeuPh	
528		eAlaSer	
Thr Glu Lys Leu Ser Gly Val Tyr		210	215
Glu His His Ile Leu His Pro His		220	
	165	aaagataagcgcatcgcctttgtgacgggccatcccgaatatga	
170	175	tcgc 720	
gcg ctt ctg acg cgt ggc ttt gat		LysAspLysArgIleAlaPheValThrGlyHisProGluTyr	
gat tca ttc ctg gca ccg cat tcg		AspAla	
576		225	230
Ala Leu Leu Thr Arg Gly Phe		235	240
Asp Asp Ser Phe Leu Ala Pro		caaacgctggcgcaggaattttccgcgatgtggaagccggac	
His Ser		tagac 768	
	180	GlnThrLeuAlaGlnGluPhePheArgAspValGluAla	

185	190	GlyLeuAsp	
cgc tat gct gac ttt ccg gca gcg	245		250
ttg att cgt gat tac acc gat ctg	255		
624	ccggatgtaccgtataactatttccgcacaatgatccgcaaaa		
Arg Tyr Ala Asp Phe Pro Ala	taca 816		
Ala Leu Ile Arg Asp Tyr Thr Asp	ProAspValProTyrAsnTyrPheProHisAsnAspPro		
Leu	GlnAsnThr		
195	260		265
200	205	270	
gaa att ctg gca gag acg gaa	ccgcgagcgagctggcgtagtcacggtaatttactgtttacaa		
gaa ggg gat gca tat ctg ttt gcc	ctgg 864		
agt 672	ProArgAlaSerTrpArgSerHisGlyAsnLeuLeuPheT		
Glu Ile Leu Ala Glu Thr Glu Glu	hrAsnTrp		
Gly Asp Ala Tyr Leu Phe Ala	275		280
Ser	285		
210	215	ctcaactattacgtctaccagatcacgccatacgaatctacggca	
220	catg 912		
aaa gat aag cgc att gcc ttt gtg	LeuAsnTyrTyrValTyrGlnIleThrProTyrAspLeuArg		
acg ggc cat ccc gaa tat gat gcg	HisMet		
720	290		295
Lys Asp Lys Arg Ile Ala Phe Val	300		
Thr Gly His Pro Glu Tyr Asp Ala	aatccaacgctggattaa		
225	230	930	
235	240	AsnProThrLeuAsp	
caa acg ctg gcg cag gaa ttt ttc	305		
cgc gat gtg gaa gcc gga cta gac			
768			
Gln Thr Leu Ala Gln Glu Phe			
Phe Arg Asp Val Glu Ala Gly			
Leu Asp			
245			
250	255		
ccg gat gta ccg tat aac tat ttc			
ccg cac aat gat ccg caa aat aca			
816			
Pro Asp Val Pro Tyr Asn Tyr			
Phe Pro His Asn Asp Pro Gln			
Asn Thr			
260			
265	270		
ccg cga gcg agc tgg cgt agt cac			
ggg aat tta ctg ttt acc aac tgg			
864			
Pro Arg Ala Ser Trp Arg Ser His			
Gly Asn Leu Leu Phe Thr Asn			
Trp			
275			

280 285  
 ctc aac tat tac gtc tac cag atc  
 acg cca tac gat cta cgg cac atg  
 912  
 Leu Asn Tyr Tyr Val Tyr Gln Ile  
 Thr Pro Tyr Asp Leu Arg His  
 Met

290 295  
 300  
 aat cca acg ctg gat taa  
 930  
 Asn Pro Thr Leu Asp  
 305

<b>[ 0 1 1 4 ]</b>	<b>[0114]</b>
<210> 26	<210>26
<211> 309	<211>309
<212> PRT	<212>PRT
<213> Escherichia coli	<213>Escherichiacoli
<400> 26	<400>26
Met Pro Ile Arg Val Pro Asp Glu	MetProlleArgValProAspGluLeuProAlaValAsnPh
Leu Pro Ala Val Asn Phe Leu	eLeuArg
Arg	1 5 10
1 5 15	GluGluAsnValPheValMetThrThrSerArgAlaSerGl
10 15	yGlnGlu
Glu Glu Asn Val Phe Val Met	20 25
Thr Thr Ser Arg Ala Ser Gly Gln	30
Glu	IleArgProLeuLysValLeulleLeuAsnLeuMetProLy
20	sLyslle
25 30	35 40
Ile Arg Pro Leu Lys Val Leu Ile	45
Leu Asn Leu Met Pro Lys Lys	GluThrGluAsnGlnPheLeuArgLeuLeuSerAsnSer
Ile	ProLeuGln
35	50 55
40 45	60
Glu Thr Glu Asn Gln Phe Leu	ValAspIleGlnLeuLeuArgIleAspSerArgGluSerAr
Arg Leu Leu Ser Asn Ser Pro	gAsnThr
Leu Gln	65 70
50 55	75 80
60	ProAlaGluHisLeuAsnAsnPheTyrCysAsnPheGlu
Val Asp Ile Gln Leu Leu Arg Ile	AspIleGln
Asp Ser Arg Glu Ser Arg Asn	85 90
Thr	95
65 70	AspGlnAsnPheAspGlyLeulleValThrGlyAlaProL
75 80	euGlyLeu
Pro Ala Glu His Leu Asn Asn	100 105
Phe Tyr Cys Asn Phe Glu Asp	

Ile Gln		110	
	85	ValGluPheAsnAspValAlaTyrTrpProGlnIleLysGln	
90	95	ValLeu	
Asp Gln Asn Phe Asp Gly Leu		115	120
Ile Val Thr Gly Ala Pro Leu Gly		125	
Leu		GluTrpSerLysAspHisValThrSerThrLeuPheValC	
	100	ysTrpAla	
105	110	130	135
Val Glu Phe Asn Asp Val Ala		140	
Tyr Trp Pro Gln Ile Lys Gln Val		ValGlnAlaAlaLeuAsnIleLeuTyrGlyIleProLysGlnT	
Leu		hrArg	
	115	145	150
120	125	155	160
Glu Trp Ser Lys Asp His Val Thr		ThrGluLysLeuSerGlyValTyrGluHisHisIleLeuHis	
Ser Thr Leu Phe Val Cys Trp		ProHis	
Ala		165	170
	130	175	
140	135	AlaLeuLeuThrArgGlyPheAspAspSerPheLeuAla	
Val Gln Ala Ala Leu Asn Ile Leu		ProHisSer	
Tyr Gly Ile Pro Lys Gln Thr Arg		180	185
145	150	190	
155	160	ArgTyrAlaAspPheProAlaAlaLeuilleArgAspTyrTh	
Thr Glu Lys Leu Ser Gly Val Tyr		rAspLeu	
Glu His His Ile Leu His Pro His		195	200
	165	205	
170	175	GluIleLeuAlaGluThrGluGluGlyAspAlaTyrLeuPh	
Ala Leu Leu Thr Arg Gly Phe		eAlaSer	
Asp Asp Ser Phe Leu Ala Pro		210	215
His Ser		220	
	180	LysAspLysArgIleAlaPheValThrGlyHisProGluTyr	
185	190	AspAla	
Arg Tyr Ala Asp Phe Pro Ala		225	230
Ala Leu Ile Arg Asp Tyr Thr Asp		235	
Leu		GlnThrLeuAlaGlnGluPhePheArgAspValGluAla	
	195	GlyLeuAsp	
200	205	245	250
Glu Ile Leu Ala Glu Thr Glu Glu		255	
Gly Asp Ala Tyr Leu Phe Ala		ProAspValProTyrAsnTyrPheProHisAsnAspPro	
Ser		GlnAsnThr	
	210	260	265
220	215	270	
Lys Asp Lys Arg Ile Ala Phe Val		ProArgAlaSerTrpArgSerHisGlyAsnLeuLeuPheT	
Thr Gly His Pro Glu Tyr Asp Ala		hrAsnTrp	
225	230	275	280
235	240	285	
Gln Thr Leu Ala Gln Glu Phe		LeuAsnTyrTyrValTyrGlnIleThrProTyrAspLeuArg	
Phe Arg Asp Val Glu Ala Gly		HisMet	

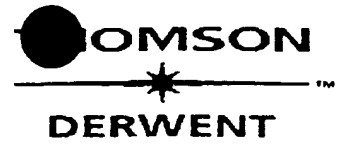
Leu Asp 290 295  
 245 300  
 250 255 AsnProThrLeuAsp  
 Pro Asp Val Pro Tyr Asn Tyr 305  
 Phe Pro His Asn Asp Pro Gln  
 Asn Thr  
 260  
 265 270  
 Pro Arg Ala Ser Trp Arg Ser His  
 Gly Asn Leu Leu Phe Thr Asn  
 Trp  
 275  
 280 285  
 Leu Asn Tyr Tyr Val Tyr Gln Ile  
 Thr Pro Tyr Asp Leu Arg His  
 Met  
 290 295  
 300  
 Asn Pro Thr Leu Asp  
 305

<b>[ 0 1 1 5 ]</b>	<b>[0115]</b>
<210> 27	<210>27
<211> 21	<211>21
<212> DNA	<212>DNA
<213> Artificial Sequence	<213>ArtificialSequence
<220>	<220>
<223> Description of Artificial Sequence:primer	<223>DescriptionofArtificialSequence:primer
<400> 27	<400>27
ccagacgcac aagaagttgt c	ccagacgcacaagaagttgtc
21	21

<b>[ 0 1 1 6 ]</b>	<b>[0116]</b>
<210> 28	<210>28
<211> 27	<211>27
<212> DNA	<212>DNA
<213> Artificial Sequence	<213>ArtificialSequence
<220>	<220>
<223> Description of Artificial Sequence:primer	<223>DescriptionofArtificialSequence:primer
<400> 28	<400>28
tagatcgtat agcgtgctct ggtagac	tagatcgtatagcgtgctctggtagac
27	27

<b>[ 0 1 1 7 ]</b>	<b>[0117]</b>
<210> 29	<210>29

JP2000-139471-A



<211> 309  
<212> PRT  
<213> Escherichia coli  
<400> 29  
Ala Met Leu Pro Val  
5

<211>309  
<212>PRT  
<213>Escherichiacoli  
<400>29  
AlaMetLeuProVal  
Five

---



**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☒ BLACK BORDERS
- ☒ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☒ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☒ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**